

Die Primärstruktur der Lactatdehydrogenase aus Schweinemuskel

- Die tryptischen Peptide -

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biochemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
WALTER KEIL
aus Hof an der Saale

1976

Die Primärstruktur der Lactatdehydrogenase aus Schweinemuskel

- Die tryptischen Peptide -



Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biochemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
WALTER KEIL
aus Hof an der Saale

1976



D a n k s a g u n g

Hiermit möchte ich Herrn Prof.Dr.G.Pfleiderer danken für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die stete Bereitschaft zur Diskussion und tatkräftigen Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr.H.H. Kiltz danke ich für die fachkundige Führung und die intensive Betreuung.

Frau G.Troost und Herrn E.Poth gilt mein Dank für die Ausführung routinemäßiger Arbeiten.

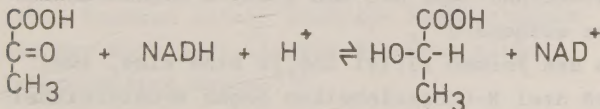
Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Material und Methoden	11
III. Modifizierung und tryptische Hydrolyse	32
IV. Isolierung der Arginin-Peptide	49
V. Subfragmentierung	65
VI. Sequenzanalysen	79
VII. Diskussion der Ergebnisse	91
VIII. Zusammenfassung	119

I. Einleitung und Problemstellung

Ein wichtiges Gebiet der gegenwärtigen biochemischen Forschung liegt in der Aufklärung des Aufbaus von Proteinen durch Ermittlung der Aminosäuresequenz- und der Röntgen - strukturanalyse, sowie in dem Versuch, jede Struktur mit den Eigenschaften und Funktionen der Proteine und mit der Entwicklungsschicht der Organismen in Beziehung zu setzen. Solche Beziehungen zwischen Struktur und Funktion von Proteinen lassen sich besonders gut an den Lactatdehydrogenasen studieren, da diese auf der Entwicklungsstufe der Wirbeltiere in Form von Isoenzymen vorliegen. Darunter versteht man solche Enzyme, die zwar die gleiche chemische Reaktion katalysieren, aber in verschiedenen Geweben mit unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung auftreten¹⁾.

Die Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) ist das letzte Enzym der Glycolysereihe. Sie katalysiert die Reaktion:



Die LDH hat ein Molekulargewicht von 144000²⁾. In Guanidin-Hydrochlorid- oder Harnstofflösung kann sie in 4 gleich große Untereinheiten vom Molgewicht 36000 dissoziieren, wobei jedoch die enzymatische Aktivität verloren geht³⁾.

Im Rohextrakt eines tierischen Organs lassen sich durch Elektrophorese bis zu fünf verschiedene Banden nachweisen, die alle LDH-Aktivität besitzen. Auf Grund dieser Beobachtung wurde nachgewiesen, daß die LDH in multiplen Formen vorkommt, die sich durch ihre katalytischen, physikalischen und immunologischen Eigenschaften unterscheiden⁴⁾.

Entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit wurden die 5 Formen des Enzyms mit den römischen Zahlen I-V gekennzeichnet, wobei der bei pH 8,6 am schnellsten zur Anode wandernden Form die Zahl I und der am schnellsten zur Kathode wandernden Form die Zahl V zugeteilt wurde. In den meisten Organen kommen alle 5 Formen vor, in bestimmten Organen ist hauptsächlich nur eine Form vertreten. Im Skelettmuskel ist es die Form V, im Herzmuskel die Form I. Das Vorhandensein 5 multipler Formen des Enzyms wird mit der unterschiedlichen Zusammensetzung aus verschiedenen Untereinheiten erklärt. Die Untereinheit der Form I wird als Herztyp mit H, die der Form V als Muskeltyp mit M bezeichnet. Die LDH I ist demnach aus 4 H-Untereinheiten, die LDH V aus 4 M-Untereinheiten aufgebaut⁵⁾.

In den Formen II, III und IV sind eine, zwei und drei H-Untereinheiten gegen M-Untereinheiten ausgetauscht. Durch ihre Homogenität sind allein die Isoenzyme H₄ und M₄ für die Sequenzanalyse von Interesse.

Das Auftreten in Form von Isoenzymen hat die LDH zu einem wichtigen biochemischen Forschungsobjekt gemacht. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, die einen Beitrag zur Erklärung der unterschiedlichen Eigenschaften der Isoenzyme leisteten. Mit dem Ziel, den Katalyse-mechanismus aufklären zu helfen, wurden reaktive Seitenketten des Enzyms chemisch modifiziert, und auf diese Weise gelangte man zu einer Reihe von Aminosäuren, denen eine wichtige Rolle bei der Katalyse zugeordnet werden konnte ⁶⁻¹²⁾. Jedoch führten diese Informationen nur zu Spekulationen über den Wirkungsmechanismus.

Präzise Aussagen über den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion des Enzyms sollten durch die Bestimmung der Aminosäuresequenz durch S.S.Taylor ¹⁴⁾ und der dreidimensionalen Struktur durch M.G. Rossmann ¹³⁾ der Dornhai-LDH-M4 erwartet werden. Die Ergebnisse der Aufklärung von Primär- und Tertiärstruktur führten zu einer umfassenden Beschreibung des Wirkungsmechanismus des Enzyms, allerdings konnten einige wichtige Beobachtungen mit der dort postulierten Struktur nicht interpretiert werden ⁴⁴⁾.

Heute sind wir in der Lage, eine Erklärung für die offenstehenden Fragen zu geben, denn

im Verlauf meiner Arbeit stellte ich gravierende Unterschiede zwischen den Primärstrukturen der Schweine-LDH-M4 und der Dornhai-LDH-M4 fest, die nicht allein mit der Spezies-Differenz erklärt werden können, zumal sie hauptsächlich im Bereich des aktiven Zentrums der LDH auftreten. Dieser für die katalytischen Eigenschaften wichtige Bereich der Struktur zeigt sogar zwischen den Isoenzymen M4 und H4 vom Schwein, die parallel untersucht wurden, ein hohes Maß an Übereinstimmung. Um so unerklärlicher sind die festgestellten Unterschiede zwischen den Primärstrukturen der M4-Isoenzyme von Dornhai- und Schweine-LDH.

Eine endgültige Antwort auf die angesprochenen Probleme wird nach einem intensiven Vergleich der Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe mit den in den USA ermittelten Röntgen-Strukturdaten der Schweinemuskel-LDH in Kürze gegeben werden können.

Um neben den Fragen, die die fertige LDH-Sequenz aufgeworfen hat, auch einen Einblick in die Problematik zu geben, die mit der Ermittlung der Tertiärstruktur eines globulären Proteins zusammenhängt, soll im folgenden Kapitel ein kurzer Abriß über die einzelnen notwendigen Schritte gegeben werden, die schließlich zu der Festlegung der Aminosäuresequenz führen.

Die dreidimensionale Anordnung der Aminosäuren stützt sich, wie schon angedeutet wurde, im Allgemeinen auf zwei Analysemethoden. Zunächst muß durch Ermittlung der Aminosäuresequenz die Primärstruktur des Proteins festgelegt werden. Dann müssen diese Ergebnisse mit den Daten der Röntgenstrukturanalyse kombiniert werden. Das ist insofern notwendig, als auch bei der 2-Å-Auflösung meist nur die Hälfte aller Seitenketten erkannt werden kann. Da parallel zu der Sequenzaufklärung der Isoenzyme der Schweine-LDH (von der die vorliegende Arbeit einen Teil darstellt) eine Arbeitsgruppe in den USA zur Zeit mit der Ermittlung der Röntgenstrukturdaten des Enzyms beschäftigt ist, erhält die Arbeit ein zusätzliches Gewicht.

Die Aufklärung der Primärstruktur eines Proteins gliedert sich grob in 4 Abschnitte (Abb.1).

Zunächst muß das hochgereinigte Protein durch chemische oder enzymatische Spaltung reproduzierbar in Fragmente zerlegt werden. Diese müssen sodann durch Gelchromatographie und Ionenaustauscherchromatographie sorgfältig voneinander getrennt werden, worauf die Aminosäurefolge eines jeden Peptids bestimmt wird. Ist dies geschehen, so kann die Primärstruktur des Proteins durch richtiges Anein-

P-R-I-M-A-E-R-S-T-R-U-K-T-U-R-D-E-R-L-D-H

a) Summenanalyse: A, D₂, E₂, H, I, K, L
M, P, R₅, S, T₂, U₂

b) Endgr. Best. : n-Term: P-R
c-Term: D-H

c) Spaltung (am R)

(P, R + A, E, I, M, R + R, S, T + K, R, T, U₂ + D, E, R + D, H, L)

Vortrennung der Peptide durch
Gelchromatographie

(A, E, I, M, R +
K, R, T, U₂)

(R, S, T + D, E, R +
D, H, L + P, R)

weitere Auftrennung
durch Ionenaustau-
scherchromatographie

A, E, I, M, R + K, R, T, U₂ + R, S, T + D, E, R + D, H, L + P, R

Sequenzanalysen

I-M-A-E-R, U-K-T-U-R, S-T-R, D-E-R, L-D-H, P-R

Abb. 1: Schematische Darstellung zur Erarbeitung
der Primärstruktur eines globulären Proteins:
Spaltung, Isolierung der Spaltstücke und
Sequenzierung.

1. Spaltung: P-R I-M-A-E-R S-T-R U-K-T-U-R D-E-R L-D-H
 2. Spaltung: P-R-I-M-A-E-R-S-T R-U-K-T U-R-D-E-R-L-D-H
 Ergebnis : P-R-I-M-A-E-R-S-T-R-U-K-T-U-R-D-E-R-L-D-H

Abb. 2 : Schematische Darstellung zur Erarbeitung der Primärstruktur eines globulären Proteins:

Zuordnung der Spaltstücke aus der ersten Spaltung durch Überlappungs -
 peptide aus der zweiten Spaltung.

anderreihen der einzelnen Peptide zusammengestellt werden. Die richtige Reihenfolge der sequenzierten Peptide ergibt sich durch eine zweite Spaltung der Proteinkette an anderen Peptidbindungen als bei der ersten Fragmentierung und durch Isolierung und Sequenzierung von überlappenden Peptiden (Abb.2)

Ein limitierender Faktor bei der Sequenz - aufklärung ist durch die begrenzte Leistungsfähigkeit des Edman-Abbaus der isolierten Peptide gegeben. Während der automatische Sequenator über 60 Stufen bewältigt, liegt die Erfassungsgrenze bei der manuellen Abbaumethode bei 15-20 Stufen. Dies hat ihre Ursache darin, daß die wichtigen Reaktionen beim Edman-Abbau, die Kupplung mit Phenylisothiocyanat und die Abspaltung der N-terminalen Aminosäure nicht quantitativ erfolgen. Im automatischen Sequenator liegt die Ausbeute pro Abbaustufe bei 90-96%, bei der manuellen Abbaumethode bei 70-85%. Selbst mit höherem Einsatz an Peptidmaterial ist es nicht möglich, die angegebenen Stufenzahlen weit zu übertreffen, da mit zunehmender Zahl der Abbaustufen der Untergrund durch unspezifische Spaltung und Extraktion des Peptids immer stärker hervortritt und keine eindeutige Zuordnung der abgespaltenen Aminosäure mehr

zuläßt. Außerdem ist ein höherer Einsatz an Peptidmaterial mit einer erheblichen Kostensteigerung verbunden, die das Ergebnis keinesfalls rechtfertigt.

In meinem Falle mußten alle Sequenzen manuell bestimmt werden. Zur vollständigen Sequenzierung durften die Peptide also nicht mehr als 20 Aminosäuren umfassen. Das bedeutet aber, daß die LDH in eine Vielzahl kleiner Peptide zerlegt werden mußte.

Die Trennung einer derart großen Zahl von Peptiden würde die Leistungsfähigkeit der Ionenaustauscherchromatographie übersteigen und stellt somit den zweiten limitierenden Faktor bei der Sequenzaufklärung dar. Gleichzeitig würde die Zuordnung der Peptide vor eine nahezu unlösbare Aufgabe gestellt.

Deshalb verfährt man folgendermaßen:

Zunächst wird die Proteinkette in möglichst wenige große Fragmente zerlegt. Diese werden sauber isoliert und jede für sich in kleinere Peptide subfragmentiert. Durch Lösen einer möglichst geringen Anzahl von Peptidbindungen bei jedem Schritt wird die Zuordnung der Teilsequenzen zu einem größeren Block wesentlich erleichtert.

Im Falle der vorliegenden Arbeit, die die Hauptaufgabe hatte, die tryptischen Peptide der Schweinemuskel-LDH zu isolieren und die Überlappungspeptide für die parallel zu die-

ser Arbeit hergestellten BrCN-Fragmente zu liefern, kann dieser Plan realisiert werden. Da Trypsin am Carboxylende der Aminosäuren Arginin, Lysin und Aminoäthylcystein (AÄ-Cys) spaltet, ist es möglich, durch reversible Blockierung der Lysin- und AÄ-Cys-Seitenreste mit Citraconsäure (2-Methyl-Maleinsäure)-Anhydrid, die LDH zunächst nur an den Arginin-Resten zu spalten. Nach Isolierung und De-blockierung der entstandenen Peptide können diese tryptisch subfragmentiert werden. Auf diese Weise gelangt man zu kleinen Peptiden, die durch den manuellen Edman-Abbau charakterisiert werden können. Da Überlappungs-peptide für BrCN-Fragmente geliefert werden sollen, müssen die methioninhaltigen Peptide sequenziert werden. Ebenfalls sequenziert werden sollen die Peptide, die Teile von großen, für den manuellen Edman-Abbau schwer zu bewältigenden BrCN-Peptiden sind. Die übrigen Peptide sollen mit Hilfe von Aminosäure- und Endgruppenanalyse eindeutig charakterisiert werden. Durch Vergleich mit den BrCN-Peptiden wird es dann möglich sein, die Gesamtsequenz der Schweinemuskel-LDH aufzustellen.

II. Material und Methoden

1) Reinheitsprüfung der LDH und Dialyse

LDH-M4 vom Schwein wurde bezogen von der Fa. Boehringer, Mannheim als 0,55 gesättigte Ammoniumsulfat-Suspension (3 gLDH/0,3L)

Reinheitskriterien:

- a) spez. Aktivität: 30 000 BE/mg
- b) SH-Gruppen: 4,45/Untereinheit
- c) NAD-Sulfit Coenzymbindungsvermögen: 1.1/Untereinheit
- d) Acetatfolienelektrophorese in 0,03M Barbitalpuffer pH 8,6, 200 V, 1 h
proteinspezifische Anfärbung mit Nigrosin und LDH-spezifische Anfärbung gaben je 1 Bande
- e) SDS-Disk-Elektrophorese gab eine Bande bei Molgewicht 35 000

Dialyse :

1 g LDH-M4 wurde 3-mal gegen je 10l $M/15$ Phosphatpuffer pH 7,2 (0,02% Mercaptoäthanol) ferner 3mal gegen je 10l H_2O (0,02% Mercaptoäthanol) dialysiert und anschließend lyophilisiert.

15)

2) Aminoäthylierung der LDH

1 g LDH-M4 vom Schwein wurde in 100 ml 8 M Harnstoff (1 M an 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol, 0,01 M an Mercaptoäthanol) gelöst. Es wurden 6x je 0,5 ml Äthylenimin (Fluka, Buchs) in 15-min. Abständen zugefügt und die Lösung noch 30 min ausgerührt. Danach wurde 3x gegen je 10l H₂O (0,05% Mercaptoäthanol, pH 8) dialysiert, anschließend lyophilisiert und der bei der Dialyse mit der ausfallenden LDH copräzipitierte Harnstoff durch Gelchromatographie an Seph G 25 F (6x120cm, 30% Essigsäure) abgetrennt. Die Reaktion wurde mit Hilfe von Aminosäureanalysen auf Vollständigkeit geprüft.

16)

3) Citraconylierung der aminoäthylierten (AA-) LDH

In Abweichung von der Vorschrift von Atassi und Habeeb wurde folgendermaßen verfahren: 600mg AA-LDH-M4 (17,1µMol) wurden in 25 ml 8 M Harnstoff (bei pH 10 vom Isocyanat befreit) gelöst. Die Lösung wurde am Autotitrator (ABU-SBR-TTT-Titriereinheit, Radiometer, Kopenhagen) auf pH 8,4 eingestellt. 1 ml Citraconsäurehydrid (Pierce) wurde in Chargen zu je 100 µl in Abständen von 10 min bei Raumtemperatur zugefügt.

Der pH wurde durch Zutitrieren von 5 M NaOH bei 8,4 gehalten. Es wurde eine Stunde lang ausgerührt. Zur Abtrennung des Salzes und des Harnstoffs wurde eine Gelchromatographie an Sephadex G 50 F (4x180 cm, 0,1 M Triäthylammoniumacetat-Puffer pH 8,6) angeschlossen. Das in einem Gipfel eluierte Proteinmaterial wurde gesammelt und lyophilisiert. In den Vorversuchen wurde dieses Material zur tryptischen Verdauung eingesetzt.

In den späteren Versuchen wurde unmittelbar vor der tryptischen Hydrolyse die citraconylierte AA-LDH-M4 (600 mg=17,1 μ Mol) in 0,1 M N-Äthylmorpholinacetatpuffer pH 8,8 gelöst. 350 μ l Citraconsäureanhydrid wurden bei Raumtemperatur in 7 Chargen zu je 50 λ in Abständen von 10 min. zugegeben, wobei der pH durch Zutitrieren von 5 M NaOH auf pH 8,6 gehalten wurde. In dieser Lösung wurde nach 15-min Ausrühren die tryptische Hydrolyse angeschlossen.

4) Tryptische Hydrolyse der CT-AA-LDH und Decitraconylierung

Nach der zweiten Citraconylierung wurden der auf 37°C erwärmten Proteinlösung 30 mg affinitätschromatographisch gereinigtes Rinder-Trypsin¹⁷⁾, gelöst in 1 ml $M/100$ HCl, zugegeben. Nach 1 Std wurde mit Essigsäure auf pH 3,4 angesäuert und eine weitere Stunde zum Decitraconylieren gerührt. Anschließend wurde der Verdauungsansatz lyophilisiert.

5) Anionenaustauscherchromatographie nach
Hilschmann¹⁸⁾

Dowex 1x2-Harz (200-400 mesh, Serva, Heidelberg) wurde in seine Acetatform überführt, neutralgewaschen und in eine 1.2 x 120 cm Säule eingefüllt, die durch einen Heizwassermantel auf 37 °C gehalten wurde.

Äquilibriert wurde mit 2l Startpuffer pH 8,5. Das auf pH 9,5 eingestellte Verdauungsprodukt wurde unter Druck aufgegeben und mit etwas äquilibriertem Harz vermengt, um ein Verklumpen der unlöslichen Peptide zu vermeiden. Eluiert wurde unter Pumpendruck (Mini Pump, Milton-Roy Co., St. Petersburg, Florida, USA) wobei Fraktionen zu 5 ml (eine Fraktion 10 min) gesammelt wurden. In ein Mischgefäß mit konstantem Volumen von 500 ml, das mit dem Elutionsmittel 1 gefüllt und mit einem Magnetrührer versehen war, wurden nacheinander folgende Komponenten eingeleitet.

Komponente	Fraktionen
1% Pyridin, 1% 2-Picolin, 1% 2,4 Lutidin, 0,1% Thiodiglycol, mit Essigsäure auf pH 8,5 eingestellt	1-30
wie 1, mit Essigsäure auf pH 7,5 eingestellt	31-80
0,1 M Essigsäure, 0,1% Thiodiglycol	81-180
0,2 M Essigsäure, 0,1% Thiodiglycol	181-300
0,5 M Essigsäure, 0,1% Thiodiglycol	301-420
3 M Essigsäure, 0,1 % Thiodiglycol	421-470
Eisessig, bis der pH Wert des Eluats unter 1 sinkt.	ab 471

Die Elutionsmittel 1-6 waren im Vorversuch 30%-ig an Propanol.

Alle Elutionsmittel müssen vor Gebrauch sorgfältig entgast werden.

6) Kationenaustauscherchromatographie über Technicon P

Das Harz (200-400 mesh, Technicon Instr. Chertsey, UK) wurde auf der Säule (0,6x 50 cm), die durch einen Heizwassermantel auf 37°C temperiert werden konnte, mit 160 ml 2 M Pyridin-Acetat-Puffer pH 5,2 in die Pyridinium-Form überführt.

Die in 10 ml 50% Ameisensäure gelöste Probe wurde unter Druck aufgegeben, nachdem vorher mit 10 ml 50% Ameisensäure gespült worden war, um bessere Haftung der Peptide zu erzielen.

Eluiert wurde unter Pumpendruck (Milton Roy, Mini Pump), wobei Fraktionen zu 3 ml gesammelt wurden. Der Fluß betrug 20 ml/h.

Eluiert wurde nach folgendem Schema:

Elutionsmittel	Fraktionen
0,1 M Pyridiniumacetat (8 ml Pyridin, 300 ml Eisessig/l, 30 % n-Propanol, pH 3,0) oder 0,2 M Pyridiniumacetatpuffer, pH 3,1 als Startpuffer. Der verwendete Puffer ist in den Elutionsdiagrammen angegeben.	1 - 27
Linearer Gradient aus 190 ml Elutionsmittel 1 und 190 ml 2 M Pyridiniumacetatpuffer (160 ml Pyridin, 50 ml ml Eisessig/l mit 30% n-Propanol), pH 5,2	28- 148
0,5 M NaOH	ab 148

7) Kationenaustauscherchromatographie an Bio Rex 70

Eine Säule (1,2 x 10 cm) wurde mit dem in der H^+ -Form vorliegenden Harz (200-400 mesh, Bio-Rad, Richmond, Calif. USA) gefüllt. Nachdem mit 20 ml HCOOH gespült worden war, wurde die Säule mit 5% HCOOH äquibriert. Die Probe wurde in 1 ml HCOOH gelöst, mit H_2O auf 20 ml verdünnt und aufgegeben. Nach dem Einsickern der Probe wurden noch 20 Fraktionen (à 3 ml) mit 5% HCOOH eluiert, dann wurden nacheinander 2 Gradienten angelegt:

1 linearer Gradient aus 100 ml 5% HCOOH und 100 ml 0,1 M Pyridin in 50% Essigsäure pH 2,4

2 linearer Gradient aus 100 ml 0,1 M Pyridin in 50% Essigsäure pH 2,4 und 100 ml 2 M Pyridin in 30% Essigsäure pH 4,5

Um noch am Harz haftendes Peptidmaterial zu lösen, wurden noch 20 Fraktionen mit HCOOH eluiert. Eventuell vorhandene Peptide wurden aus diesen Fraktionen mit Fluorescamin¹⁹⁾ per Tüpfelreaktion bestimmt.

8) Peptidbestimmung nach Moore und Stein²⁰⁾

Die Peptidbestimmung wurde nach jeder Säulen-chromatographie von den eluierten Fraktionen durchgeführt. Dazu wird ein aliquoter Anteil, etwa 100-200 nMol Aminosäure enthaltend, pro Fraktion entnommen und mit 0,25-0,5 ml 4 M NaOH in Polypropylenröhrchen 1 1/2 h im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Neutralisierung mit

4 M HCl wird zugegeben:

1 ml Puffer pH 5,51, zusammengesetzt aus

544 g Na-Acetat x 3 H₂O

100 ml Eisessig

7,5 ml Ameisensäure

mit H₂O ad 1 l

und 1 ml 3%-ige Ninhydrinlösung in Methylcellosolve. Dieses Gemisch wird gut durchgeschüttelt und 15 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Extinktion bei 578 nm im Eppendorf-Photometer in 1 cm Küvetten gemessen.

9) Tüpfelreaktion mit Fluorescamin (Fluram) ¹⁹⁾

5 µl (enthaltend 1-2 n Mol Peptid) pro Fraktion werden auf eine DC-Fertigplatte gebracht und mit einer Lösung aus 0,6 mg Fluram (Serva, Heidelberg) in 10 ml Aceton (Uvasol, Merck) besprüht. Bei 350 nm im UV-Licht können proteinhaltige Fraktionen an der weißen Fluoreszenz identifiziert werden.

10) Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographien wurden zur Reinheitsprüfung im Anschluß an Säulenchromatographien herangezogen. Dazu wurden 10-20 n Mol Peptid gebraucht. Es wurden DC-Fertigplatten SIL-G 25 der Fa. Macherey-Nagel benutzt.

Fließmittel: n-Butanol 34
 Pyridin 20
 Eisessig 7
 Wasser 12,5

Entwickler :

1) Ninhydrinreagens nach Clotten²¹⁾

1 g Ninhydrin
 60 ml Methanol
 350 ml n-Butanol
 30 ml 2 M Essigsäure

Die getrocknete Dünnschichtplatte wird mit dem Ninhydrinreagens leicht eingesprüht, so daß die Oberfläche feucht ist. Dann wird sie 10-15 min bei 100 °C im Trockenschrank erhitzt. Die entstandenen Flecken werden sofort abgezeichnet.

2) Cl₂/J Reagens nach Rydon und Smith²²⁾

Cl₂-Atmosphäre: in einem Chromatographietank werden je 5 ml 0,1 m KMnO₄-Lösung und 10%-ige HCl zusammengegeben.

Färbelösung: 1 Teil M/20 KJ-Lösung und 4 Teile Benzidin in 20%-iger AcOH (unmittelbar vor der Färbung ansetzen).

Nach der Ninhydrinanfärbung werden die Platten mit Wasserdampf leicht angefeuchtet und für 7 min in die Cl₂-Atmosphäre getaucht. Nach erfolgter Chlorierung wird das Pherogramm gefächelt, bis kein Cl₂-Geruch mehr festzustellen ist. Dann wird mit der Färbelösung besprüht.

11) Aminosäureanalyse

Von jeder Fraktion, die diskelektrophoretisch und chromatographisch einheitliches Material enthielt, wurden Aminosäureanalysen auf einem Bio-Cal BC-200 Aminosäureanalysator mit automatischem Probenaufgeber angefertigt. Dazu wurden 10-50 nMol Peptid in einem Duran-Reagenzglas mit 0,5 ml 6 M HCl versetzt und unter Vacuum abgeschmolzen. Die Hydrolysedauer betrug normalerweise 20 h, für eine genaue Bestimmung der Aminosäuren Valin und Iso-leucin wurden zusätzlich 96 h-Hydrolysen angefertigt. Zur Bestimmung des bei der HCl-Hydrolyse zerstörten Tryptophans wurde mit 3 M Mercaptoäthansulfonsäure (MAS) 24-96 h bei 110° C hydrolysiert.

Die hydrolysierten Proben wurden im Falle der HCl-Hydrolysen im Vacuum eingedampft, mit Aufgabepuffer aufgenommen und analysiert, im Falle der MAS-Hydrolysen wurde mit Natronlauge zu 2/3 neutralisiert, mit Wasser auf das benötigte Probenvolumen aufgefüllt und ebenfalls analysiert.

In den Tabellen sind 96 h-Hydrolysen bzw. Tryptophanbestimmungen mit MAS-Hydrolysen kenntlich gemacht.

12) Aminosäureanalyse von Disk-Banden²³⁾

Die mit Amidoschwarz oder Coomassie-Brilliant-Blue angefärbten Banden aus Disk-Elektrophoresen werden mit einer scharfen Rasierklinge ausgeschnitten, wobei ein direkter Kontakt mit den Fingern vermieden werden soll.

In einem Duran-Reagenzglas werden die Banden mit 3 ml 6 M HCl und 25 μ l Mercaptoäthanol versetzt und unter Vacuum abgeschmolzen. Nach einer Hydrolysedauer von 20 h bei 110°C wird im Eisbad abgekühlt und die ausgefallene Polyacrylsäure abzentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig abgehebert und der Rückstand 3x mit je 1 ml 1 M HCl gewaschen, wobei nach Erhitzen auf 80°C, Mixen und anschließendem Abkühlen die ausgefallene Polyacrylsäure abzentrifugiert wird. Die Überstände werden vereinigt, zur Trockne eingedampft, mit Aufgabepuffer pH 2,2 aufgenommen und im Aminosäureanalysator auf ihre Zusammensetzung geprüft. Man beachte die dabei auftretenden zu hohen Werte für Serin und Glycin. Glycin stammt aus dem Elektrodenpuffer der Disk-Elektrophorese, Serin ist wahrscheinlich auf Verunreinigungen durch Staub zurückzuführen. Tryptophan wird bei den Hydrolysebedingungen zerstört.

13) Sequenzanalyse ²⁴⁾

Sequenzanalysen wurden von Peptiden angefertigt, die sich diskelektrophoretisch und chromatographisch einheitlich verhielten. Sie wurden nach der von P. Edman beschriebenen Phenylisothiocyanat-(PITC) Methode abgebaut. Lysin-haltige Peptide wurden dabei durch die Umsetzung der Aminogruppe mit PITC in organischen Lösungsmitteln löslich und wurden extrahiert. Sie mußten deshalb in einem zweiten Abbau in der

ersten Stufe mit Sulfo-PITC umgesetzt werden, wodurch sie ihren hydrophoben Charakter verlieren.

1) Kupplung:

0,2 - 1 μ Mol Peptid werden in 0,5 ml Dimethylallylamin (DMAA)-Puffer (0,4 M DMAA-TFA-Puffer in Pyridin-Wasser 3/2 v/v, Pierce, sequanal grade) pH 9,5 gelöst. 50 μ l PITC (Merck) bzw. 50 μ l einer 5%-igen 4-Sulfo-PITC (Pierce)-Lösung werden zugesetzt die Lösung unter N_2 verschlossen, gemischt und 30 min. bei 57°C gehalten, wobei in Abständen von 10 min durchgemischt wird. Dann wird die Lösung eingefroren und im Vacuum abgedampft. Der Rückstand wird nach Belüften mit N_2 3-mal mit je 0,5 ml Benzol (2xumkristallisiert und unter N_2 destilliert), extrahiert um überschüssiges PITC zu entfernen. Der Rückstand wird im Vacuum getrocknet.

2) Abspaltung:

Der getrocknete Rückstand wird mit 0,5 ml Trifluoressigsäure (TFA) versetzt, unter N_2 gemischt und 5 min. bei 57°C im Wasserbad erwärmt. Danach wird mit N_2 trockengeblasen.

3) Extraktion:

Das trockene Material wird 3-mal mit je 0,5 ml Chlorbutan versetzt, gemischt, zentrifugiert und die Chlorbutanphase abgehebert. Der Rückstand wird im Vacuum getrocknet und für die nächste Kupplung beiseite gestellt.

4) a. Bei Nachweis der PTH-Aminosäure durch
DC und Rückspaltungsanalyse :

Die vereinigten Chlorbutanphasen werden im N_2 -Strom trockengeblasen und der Rückstand in 1,0 ml Chlorbutan aufgenommen. 50 μ l werden entnommen, in ein Reagenzglas überführt und nach Trockenblasen mit N_2 mit 0,75 ml 6 M HCl (0,1% $SnCl_2$) versetzt. Die Probe wird 5 Std bei 150°C hydrolysiert und die abgespaltene Aminosäure nach Abziehen der HCl im Aminosäureanalysator bestimmt.

4) b. Bei Nachweis der PTH-Aminosäure durch
DC: Cylisierung

Die zweite Hälfte des Chlorbutanextraktes (bei Detektion ohne Rückspaltungsanalyse wird der gesamte Chlorbutanextrakt eingesetzt) wird in ein Spitzreagenzglas überführt, mit N_2 trockengeblasen, mit 0,2 ml 1 M HCl versetzt und 10 min auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird 3-mal mit je 0,5 ml Essigsäure-äthylester extrahiert. Die vereinigten Esterphasen werden in einem Spitzreagenzglas mit N_2 trockengeblasen und in 50 μ l Aceton aufgenommen.

5) Nachweis durch DC:

Nach Zentrifugieren wird die gelöste PTH-Aminosäure auf eine DC-Fertigplatte-25 UV 254 mit Silgur-Beschichtung (Macherey-Nagel) aufgetragen und durch Chromatographie in 3

verschiedenen Fließmitteln durch Vergleich mit 2 Standardgemischen von PTH-Aminosäuren identifiziert.

Standard 1: Leu,Pro,Phe,Trp,Tyr,Thr,Ser,Glu,
Gln

Standard 2: Ile,Val,Ala,Gly,Lys,Asp,Asn

Die 3 Fließmittel und die in jedem System identifizierbaren Aminosäuren sind:

Fließmittel 1: 80 ml Benzol
20 ml Essigsäureäthylester

erfaßt werden: Leu,Pro,(Phe,Met) Trp,Tyr,
(Thr,Ser); Ile,Val,Ala,Gly,
(Lys,AA-Cys)

Dabei zeichnet sich PTH-Ile durch einen Doppelfleck aus, der auf die Bildung von PTH-allo-Ile neben PTH-Ile zurückzuführen ist.

Fließmittel 2: 90 ml Äthylenchlorid
16 ml Essigsäure

Bestätigung von Thr,Ser; neu : Glu,Asp.

Fließmittel 3: 70 ml Chloroform
30 ml Methanol
2 ml Essigsäure

Trennung von Asn und Gln.

Die PTH-Derivate von Methionin und Phenylalanin können in der DC ebenso wenig getrennt werden wie Lysin und Aminoäthylcystein. Sie werden deshalb mit Histidin und Arginin, die bei der Essigesterextraktion in der wässrigen Phase bleiben, per Rückspaltung und Aminosäureanalyse bestimmt. Dabei ist zu beachten, daß die Rückspaltungsanalyse von PTH-Alanin, PTH-AA-Cystein und PTH-Serin

in jedem Fall Alanin ergibt, aus PTH-Thr wird α -Aminobuttersäure und PTH-Trp ergibt manchmal Gly und Ala, manchmal wird es total zerstört. Das PTH-Derivat von Ile zeigt wie in der DC allo-Ile neben Ile, wobei der Anteil von allo-Ile mit höherer Hydrolysentemperatur ansteigt. Für eine eindeutige Bestimmung von Alanin, Serin und AÄ-Cystein ist also unbedingt eine Kombination der Ergebnisse von DC und Rückspaltung notwendig während PTH-Thr durch α -Aminobuttersäure in der Rückspaltungsanalyse sicher zugeordnet werden kann. Das DC-Ergebnis im Falle von PTH-Trp ist eindeutig, die Rückspaltung kann nur zur Bestätigung herangezogen werden, allein reicht sie zur Bestimmung von Trp nicht aus. Die Bestimmung aller anderen Aminosäuren gelingt auch allein mit Hilfe der Rückspaltungsanalyse.

14) Disk-Elektrophorese

Disk-Elektrophoresen wurden nach den Systemen von H. Tamura²⁵⁾ und H. R. Maurer²⁶⁾ durchgeführt. ²⁵⁾

1) Lösungen für Disk-Elektrophoresen bei pH 9,5

Lösung A: 48 ml 1 M HCl
 22 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol
 (AMPD), Fluka, Buchs)
 0,46 ml N,N,N',N'-Tetramethyl-
 äthylendiamin (TEMED, Serva) ad
 100 ml, pH 9,5

Lösung B: 37 ml 1 M HCl
5 g AMPD
0,46 ml TEMED
48 g Harnstoff (Merck)
ad 100 ml pH 7,8

Lösung C: 28 g Acrylamid (Serva)
0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid
(Bis, Serva)
ad 100 ml

Lösung D: 10 g Acrylamid
2,5 g Bis
48 g Harnstoff
ad 100 ml

Lösung E: 36 g Harnstoff
ad 100 ml

Lösung F: 0,2 g Ammoniumpersulfat (Serva)
ad 1 ml

Lösung G: 4 mg Riboflavin (Merck)
36 g Harnstoff
ad 100 ml

Lösung H: 48 g Harnstoff
ad 100 ml

Lösung K: 30 g Acrylamid
2 g Bis
48 g Harnstoff
ad 100 ml

Elektrodenpuffer-Stocklösung:

14 mg AMPD
57,6 g Glycin (Merck)
ad 1 l, pH 8,8

Elektrodenpuffer: 50 ml Stocklösung ad 500 ml

Färbelösungen:

- a) Zum direkten Anfärben während der Elektrophorese: 0,5%-ige wässrige Amidoschwarzlösung
- b) nach der Elektrophorese: 0,5% Amidoschwarz in 7,5% Essigsäure
- c) zur Anfärbung nach SDS-Diskelektrophoresen 0,25%-ige Coomassie-Brillant-Blue in Methanol/Eisessig/Wasser (5/1/5) Coomassie-Brillant-Blue und Amidoschwarz 10 Extra wurden von Serva, Heidelberg bezogen.

2) Lösungen für Disk-Elektrophoresen bei pH 4,3 ²⁶⁾

Lösung L: 48 ml 1N KOH
 17,2ml Eisessig
 4 ml TEMED
 ad 100 ml, pH 4,3

Lösung M: 48 g Harnstoff
 20 ml H₂O
 2,9 ml Eisessig
 0,46ml TEMED
 10 ml 4 M KOH
 ad 100 ml, pH 6,7

Elektrodenpuffer-Stocklösung

31,2 g β -Alanin
 8 ml Eisessig
 ad 1 l, pH 4,5

zum Gebrauch 1:10 verdünnen.

3) Gelsystem für Disk-Elektrophoresen bei pH 9,5 mit SDS ²⁵⁾

Natriumdodecylsulfonat (SDS) wurde bezogen von Fa. Schuchardt, München.

a) Trenngel:

9,3 ml Lösung K
 3 ml Lösung A
 2,7 ml Lösung H
 7,1 ml H_2O
 0,24 ml 10%-ige wässrige SDS-Lsg.
 0,15 ml Lösung F

Die Gele werden nach dem Gießen mit 0,1%-iger wässriger SDS-Lsg. überschichtet; die Polymerisation dauert ca. 30 min, dann überschichtete SDS-Lsg. abschleudern.

b) Sammelgel:

0,6 ml Lösung B
 1,2 ml Lösung D
 2,4 ml Lösung H
 0,6 ml Lösung G
 0,05 ml 10% SDS

Die Gele werden mit 0,1% SDS überschichtet und 30 min mit UV-Licht bestrahlt.

c) Elektrodenpuffer:

der unter 1) angegebene Probenpuffer wird 0,1%-ig an SDS gemacht.

d) Probenpuffer:

38 g Harnstoff
 10 ml Mercaptoäthanol (Merck)
 60 ml 10%-ige SDS-Lsg.
 25 ml Lösung B

Die Proben werden in 2 Teilen Probenpuffer und 1 Teil 8 M Harnstoff gelöst, 1h bei 80°C incubiert und auf die Gele aufgetragen.

Als Standard dient eine Lösung von je 3 mg/ml LDH, Chymotrypsinogen, Myoglobin, Cytochrom C, Kallikreininhibitor und Insulin in 8 M Harnstoff.

Die Front wird durch Zusetzen von 1 μ l einer 0,5%-igen wässrigen Bromphenolblau-Lsg. zu den gelösten Proben markiert.

e) Elektrophorese:

Sammeln : 1 h 2 mA/Gel

Trennen : 3 h 3 mA/Gel

Kathode oben

Die Glasröhrchen werden vorsichtig zerschlagen und die Gele zum Entfernen des Harnstoffs 1 h mit 7,5 proz. Essigsäure gerührt. Dann wird 1 h mit Coomassie-Brillant-Blue angefärbt (siehe 1)) und mit 7,5 proz. Essigsäure, die 30%-ig an Methanol ist, entfärbt.

4) Gelsystem für Disk-Elektrophorese bei pH 9,5²⁵⁾

a) Trenngelpuffer:

2 ml Lösung A

10 ml Lösung E

4 ml Lösung C

0,1 ml Lösung F

Überschichtet wird mit H₂O, die Polymerisation dauert 30 min.

b) Sammelgelpuffer:

0,6 ml Lösung B

1,2 ml Lösung D

2,4 ml Lösung H

0,6 ml Lösung G

Überschichtet wird mit H₂O, die Gele werden zur Polymerisation 30 min mit UV-Licht bestrahlt

c) Probenpuffer:

1 Teil Lösung B
7 Teile " H

d) Elektrophorese:

Sammeln 30 min 1 mA/Gel
Trennen 2,5 h 3 mA/Gel
Kathode oben

Die Anfärbung geschieht hier während der Elektrophorese. Dazu werden 1,5 ml einer 0,5%-igen wässrigen Amidoschwarz-Lösung in das obere Pufferreservoir gegeben. Die Frontmarkierung übernimmt der Farbstoff. Nach Entnahme der Gele wird mit 7,5%-iger Essigsäure entfärbt.

5) Gelsystem für Diskelektrophorese bei pH 4,3²⁶⁾

a) Trenngel:

5 ml Lösung L
10 ml Lösung C
16,5ml Lösung H
3,5ml 2% Triton-x100
0,25ml Lösung F

Überschichtet wird mit H₂O, die Polymerisation dauert ca. 30 min.

b) Sammelgel:

0,75 ml Lösung M
1,5 ml Lösung D
0,75 ml Lösung G
3,0 ml Lösung H

Überschichtet wird mit H₂O, zur Polymerisation werden die Gele 30 min mit UV-Licht bestrahlt.

c) Probepuffer:

1 Teil Lösung M

7 Teile Lösung H

Die Front wird markiert durch Zugabe von 1 μ l einer 0,5 proz. Lösung von Methylenblau in jede Probelösung.

d) Elektrophorese:

1 h Sammeln bei 2 mA/Gel

3 h Trennen bei 5 mA/Gel

Anode oben

Nach der Entnahme der Gele aus den Glasröhrchen wird der Harnstoff durch 1-stündiges Rühren in 7,5 proz. Essigsäure entfernt. Dann wird 30 min mit 0,5%-iger Amidoschwarz-Lösung angefärbt. Entfärbung wird in 7,5%-iger Essigsäure durchgeführt.

15) Amino-peptidase-M²⁷⁾ Verdauung

Amino-peptidase -M (APM)-Verdauung wurde bei einigen Peptiden zur Aufklärung der N-terminalen Aminosäuren benutzt. In einem Fall wurde durch Zeitstudie einer APM-Verdauung die Sequenz eines Hexapeptids aufgeklärt.

10-30 nMol Peptid werden in 0,3 ml 0,2 M N-Äthylmorpholinacetat-Puffer pH 7,5 auf 37°C erwärmt und mit 1 μ l einer 0,1 proz. APM-Lösung versetzt. Nach 1 h wird mit Analysator-Aufgabepuffer pH 2,2 verdünnt und die Lösung direkt mit dem Aminosäureanalysator auf freie Aminosäuren untersucht.

Bei einer Zeitstudie werden im Abstand von 10 min Proben entnommen. Per Aminosäureanalyse wird dann die Zunahme der einzelnen Aminosäuren verfolgt.

III. Modifizierung und tryptische Hydrolyse

III.1. Prinzip

Nach den Ergebnissen der Aminosäureanalyse besitzt die Schweine-LDH-M4 26 Lysin- und 11 Argininreste.²⁸⁾ Direkte tryptische Hydrolyse läßt also 38 Peptide erwarten. Bekanntlich ist es schwierig, eine so große Anzahl von Peptiden sauber zu trennen,²⁹⁾ zumal bei direkter tryptischer Hydrolyse der LDH-M4 große, außerordentlich schwerlösliche Corepeptide entstehen. So konnte Mella³⁰⁾ bei seinen Arbeiten an der Sequenz der LDH-M4 immer nur Peptide mit maximal 15 Aminosäuren isolieren, während die größeren Peptide, zumal aus hydrophoben Regionen der LDH, nicht getrennt werden konnten. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, mußte einmal die Zahl der möglichen Spaltstellen vergrößert werden, denn dadurch würde die Gefahr kleiner, daß große, schwer lösliche Peptide entstünden. Zum anderen mußte die Anzahl der Peptide pro Trennoperation verringert werden. Damit verbinden sich zwei Vorteile. Mit sinkender Anzahl von Peptiden steigt die Chance einer sauberen Trennung. Auf der anderen Seite wird die Zuordnung der Peptide und der Überlappungen wesentlich vereinfacht, wenn größere Proteinfragmente zur Verfügung stehen, die nachträglich in kleinere gespalten werden können.

III.2. Strategie

Um neue Spaltstellen einzuführen, wurden die Cysteinreste aminoäthylisiert, denn Aminoäthyl-(AA)-Cystein wird von Trypsin an der Carboxylbindung angegriffen. Da Mella von 5 Cystein-haltigen Peptiden nur 2 gefunden hatte (Tab.1), lag der Schluß nahe, daß 3 der großen, schwer löslichen Peptide Cystein enthielten, und daß sie auf diese Weise in kleinere Peptide zerlegt werden konnten.

Um die Anzahl der zu trennenden tryptischen Peptide zu reduzieren, wurden die ϵ -Aminogruppen der Lysine und AA-Cysteine mit Citraconsäureanhydrid reversibel blockiert. Dadurch trugen nur noch die 11 Argininreste zur Bruchstückbildung bei. Bei der tryptischen Hydrolyse sollten also 12 Peptide entstehen. Dabei stellt sich die Frage, warum zur Blockierung der ϵ -Aminogruppen nicht die etwas unkompliziertere Methode der Maleylierung gewählt wurde. Der Grund hierfür liegt in der leichteren Abspaltbarkeit der Citraconsäuregruppen. Während für Maleylgruppen bei pH 3,5 und 37°C eine Halbwertszeit von 12 Std berichtet wird, liegt diese im Falle der Citraconylgruppen bei 20°C nur bei 2 Std. Hinzu kommt noch, daß maleylierte LDH die gleichen Probleme der Löslichkeit stellt wie denaturierte, so daß an eine Abspaltung der Maleylgruppe bei pH 3,5 nicht zu denken ist. Längeres Behandeln des maleylierten Proteins mit Säuren (man muß

mehrere Tage bei saurem pH abspalten, um einheitliches Produkt zu erhalten) führt jedoch in erhöhtem Maße zu Säureamidspaltungen. H.J.Torff berichtete von diesen Problemen bei der Demaleylierung von Hühner-LDH.³²⁾

III.3. Vorversuche

In Vorversuchen erwies es sich, daß die Citraconylierung sehr leicht¹⁶⁾, reversibel verlief, obwohl die Literatur Stabilität im pH-Bereich 7-9 voraussagte und ein pH von 8,6 peinlichst eingehalten wurde. Zum Beispiel löste sich citraconylierte LDH nach einmaligem Lyophilisieren gut in 0,1 M Triäthylammoniumacetatpuffer pH 8,6, während Schwierigkeiten auftraten, wenn 2- oder 3-mal umlyophilisiert worden war. Vermutlich löste sich ein Teil der Citraconsäuregruppen beim Gefriertrocknen vom Protein.

Anfangs wurde die citraconylierte (CT) AA-LDH 20 h mit TPCK behandeltem Rinder-Trypsin (Serva) verdaut. Dies führte jedoch nicht zu den erwarteten 12 Peptiden, sondern es ergab sich eine große Anzahl von Peptiden, viele mit Lysin als carboxylterminale Aminosäure.

In der Disk-Elektrophorese waren keine definierbaren Banden zu identifizieren. Vielmehr ergaben die vielen Peptide sehr ähnlichen Molekulargewichts breite Zonen, hauptsächlich

im Molgewichtsbereich 3000-5000. Daneben fanden sich einzelne Peptide, die weder Lysin noch Arginin enthielten, also auf chymotryptische Hydrolyse hinwiesen.

Das Peptidgemisch wurde auf Sephadex G 50 F (4x120 cm, 0,1 M Triäthylammoniumacetat, pH 8,5) vorgetrennt (Abb.3).

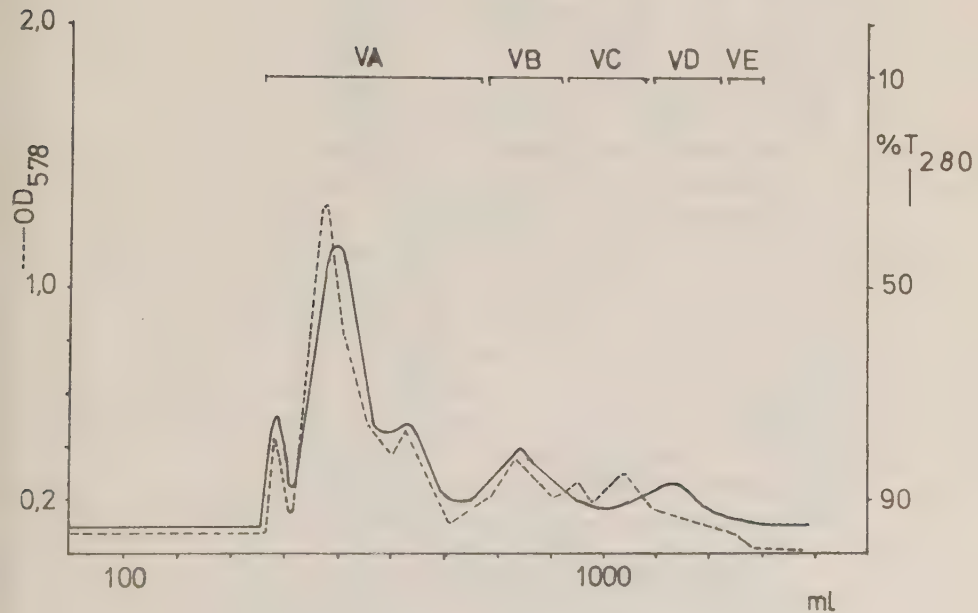


Abb. 3. Vorversuche:

Tryptische Peptide von CT-AA-LDH-M4 auf Seph G 50 F (4x120 cm, 0,1 M Triäthylammoniumacetat pH 8,5).

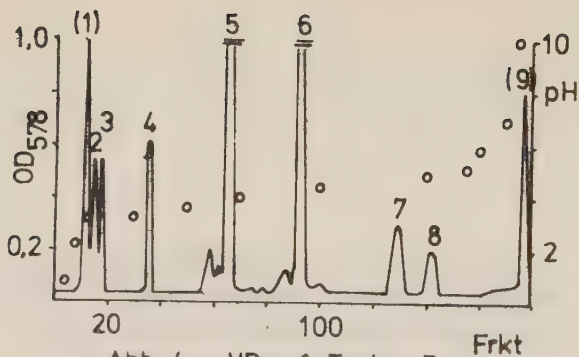


Abb. 4a: VD auf Techn. P

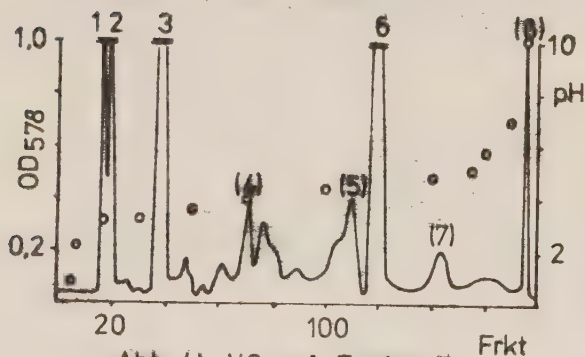


Abb. 4b VC auf Techn. P

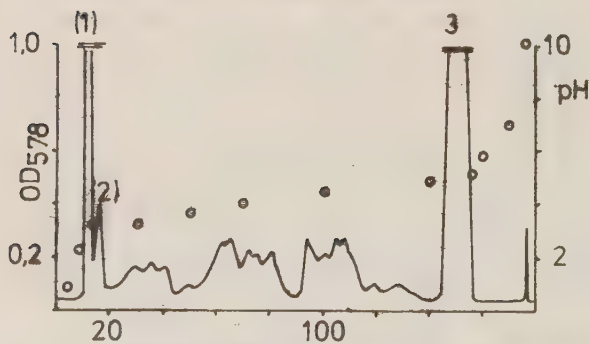


Abb. 4c: VB auf Techn. P Frkt

Abb. 4a-c: Rechromatographien der Fraktionen VB-VD von Seph G 50 F an Technicon P. Die in Klammern stehenden Fraktionen enthielten Peptidgemische, die nicht weiter aufgetrennt wurden.

Von den Fraktionen VB, VC und VD (der Buchstabe V soll für Vorversuch stehen), die die kleinen Arginin-Peptide enthalten sollten, wurden Kationenaustauscherchromatographien an Technicon P (0,2 M Pyridinacetat als Startpuffer) vorgenommen (Abb. 4 a-c). Die aus diesen Läufen isolierten Peptide sind in Tabelle 1 dargestellt. In Fraktion VE wurden durch Aminosäureanalysen und vergleichende Fingerprint-Analysen (1. Richtung: 1 Std , 1000 V, 1,25 M Pyridinacetat pH 6,5; 2. Richtung: DC) Phe-Arg, Ser-Arg und freies Arg gefunden.

Die in Fraktion VA enthaltenen Peptide verhielten sich, wie schon beschrieben, diskoelektrophoretisch unheitlich. Um definierte Peptide zu erhalten, wurde das gesamte Material im Sauren decitraconyliert und tryptisch nachverdaut (E: S= 1:100, 37°C 1,5 h). Die entstandenen Peptide wurden zunächst auf Dowex 1x2 (1,2 x 120 cm) nach Hilschmann mit propanolhaltigen Puffern vorgetrennt (Abb.5). Einzelne Gipfel wurden nach dem Ergebnis der DC zusammengefaßt und auf Technicon P (0,9 x 50 cm, 0,2 M Pyridinacetat) nachgereinigt. Die Fraktionen Nr. 250-520 enthielten, wie durch DC und Disk-Elektrophorese festgestellt wurde, Peptidmaterial von hohem Molekulargewicht. Sie wurden unter VA-8 zusammengefaßt und über Seph G 50F getrennt. Aus Peak VA-8-4 konnte durch Nachreinigung über Dowex 1x2 (0,6 x 66 cm) ein Peptid mit 2 Methionin-Resten sauber isoliert werden.

Die Abbildungen 6 und 7 geben eine Übersicht

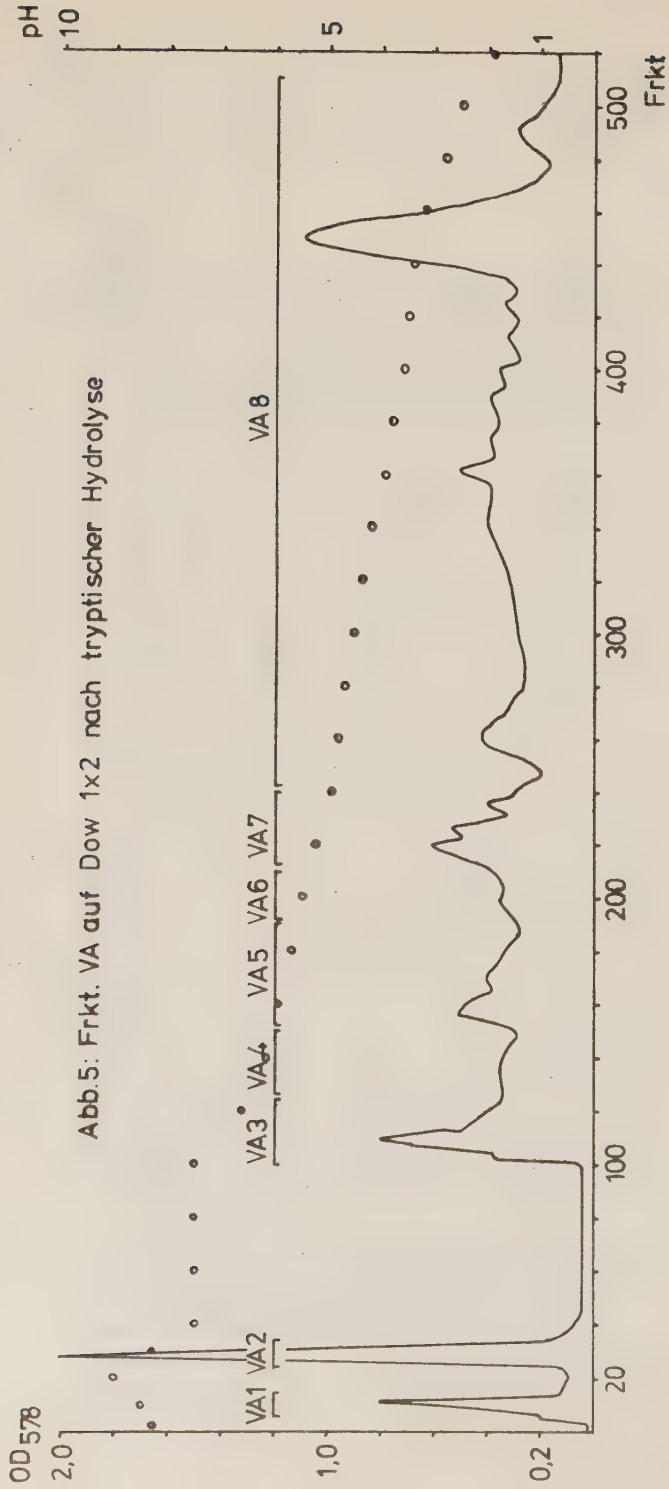


Abb.5: Frkt. VA auf Dow 1x2 nach tryptischer Hydrolyse

Abb.5 : Fraktion VA von Seph G 50 F auf Dowex 1x2 (1,2 x 120 cm nach Hilschmann) nach tryptischer Subfragmentierung.

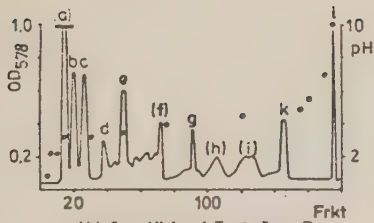


Abb. 6a: VA1 auf Technikon P

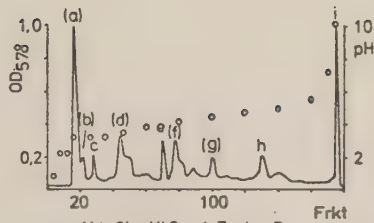


Abb. 6b: VA2 auf Techn. P

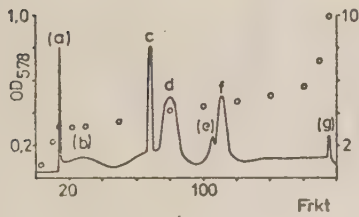


Abb. 6c: VA 3 auf Techn. P

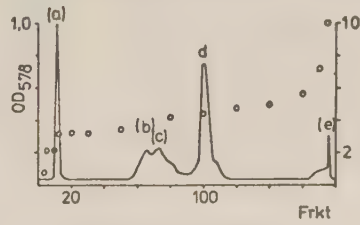


Abb. 6d: VA5 auf Techn. P

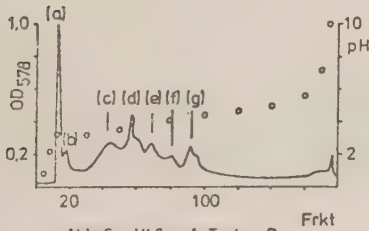


Abb. 6e: VA6 auf Techn. P

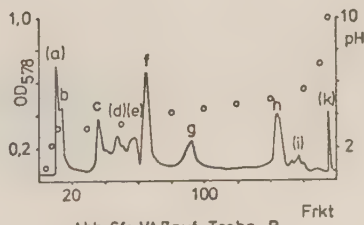


Abb. 6f: VA7 auf Techn. P

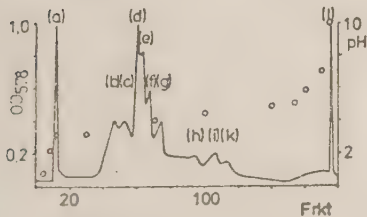


Abb. 6g: VA4 auf Techn. P

Abb. 6 a-g Vorversuche:
Rechromatographien der Peaks
VA 1-VA 7 von Dowex 1x2 auf
Technikon P. Die in Klammern
stehenden Gipfel enthielten
Peptidgemische, die nicht
weiter aufgetrennt wurden.

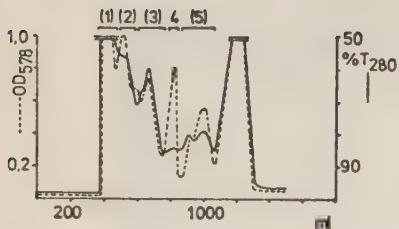


Abb. 7a: VA 8 auf Seph G 50F

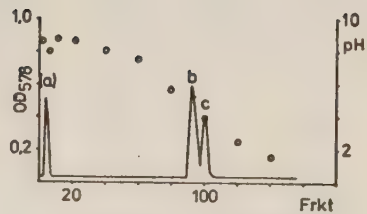


Abb. 7b: VA 8-4 auf Dow 1X2

Abb. 7 a u. b: Vorversuche:

Rechromatographie von Peak VA 8
 von Dowex 1x2 auf Seph G 50 F .
 und Reinigung des Gipfels VA 8-4
 auf Dowex 1x2 .

Über die durchgeführten Reinigungsschritte. Die isolierten Peptide sind in Tab.1 aufgeführt. Nach Einordnen in die Sequenz wurden sie mit den entsprechenden Bezeichnungen versehen.

Prkt AS	VD-2	VD-3 + VC-2	VD-4 + VC-3	VD-5	VD-6	VD-7	VD-8	VC-6	VB-2
Asp			0,99 (1)	1,20 (1)			0,92 (1)	2,08 (2)	3,00 (3)
Thr		1,00 (1)				0,90 (1)			1,95 (2)
Ser	2,00 (2)	3,70 (4)		1,00 (1)	1,00 (1)			2,09 (2)	1,89 (2)
Glu									
Pro		1,08 (1)	1,05 (1)		1,02 (1)	1,07 (1)			0,99 (1)
Gly			1,98 (2)					2,11 (2)	1,11 (1)
Ala			1,50 (2)	0,85 (1)				1,00 (1)	1,02 (1)
Val								0,68 (1)	1,59 (2)
Met					0,99 (1)				
Ile			0,94 (1)					0,60 (1)	0,60 (1)
Leu	1,00 (1)		0,93 (1)	1,92 (2)	1,02 (1)		1,03 (1)	0,83 (1)	
Tyr					0,97 (1)				0,92 (1)
Phe	0,97 (1)								
His									
Lys						1,07 (1)			1,91 (2)
AX-Cys								0,95 (1)	
Trp									
Arg		0,97 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)		0,96 (1)	0,98 (1)	0,96 (1)
Summe	4	7	9	6	6	3	3	12	17
% Ausb.	2	25	53	54	75	22	23	48	54
Hella		N	M	M	M	M	M	M	
Böhm	B	B	B	B	-	-	B	B	B
Leopold	CTIIIb8	CTIX	CTVIII	CTX	CTXI	CTVt1	CTIt8	CTVII	CTV

Tab. 1: Tryptische Peptide aus den Vorversuchen

Frkt	VA-8-a-b	VA-1-b	VA-1-c +VA-1-k	VA-1-d	VA-1-e +VA-1-l	VA-1-g	VA-2-c	VA-2-e	VA-2-h
AS	VA-8-a-c								
Asn	3,90 (4)		1,05 (1)		1,12 (1)			1,86 (2)	
Thr		0,95 (1)		1,00 (1)		1,02 (1)			1,06 (1)
Ser	1,15 (1)	1,04 (1)				1,10 (1)	0,98 (1)		
Glu	4,86 (5)								
Pro		1,18 (1)				1,01 (1)	1,06 (1)		1,05 (1)
Gly	2,14 (2)			1,12 (1)			1,00 (1)		
Ala	1,99 (2)			1,92 (2)			0,56 (1)	0,56 (1)	
Val	1,97 (2)	0,89 (1)		1,52 (2)		1,00 (1)			
Met	2,35 (3)	0,75 (1)				0,87 (1)			
Ile	1,07 (1)					1,95 (2)		0,75 (1)	
Leu	5,52 (6)		1,00 (1)	0,96 (1)			1,64 (2)		
Tyr				1,04 (1)					
Phe	0,83 (1)							0,57 (1)	
His	1,01 (1)	0,59 (1)				0,72 (1)	0,36 (1)		
Lys	2,10 (1)	1,10 (1)				1,07 (1)	0,81 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)
ÄÄ-Cys									
Trp									
ARG	0,87 (1)		0,98 (1)	1,04 (1)	1,00 (1)				
Summe	30	9	3	9	2	10	8	6	3
% Ausb.	7	8	11,5	2,7	7	2,3	4	4	10
Mella	-	M	M	M	M	-	-	M	M
Böhn	-	B	B	B	B	-	-	B	-
Peptid	CTIIIt6-8	CTIIIt1	CTIt8	CT VIII	CTIVt7	CTIIIt1 +CTXIII	CTIt1	CTIVt1	CTVt1

Tab. 1 Fortsetzung

Frkt As	VA-2-i	VA-3-c	VA-3-d	VA-3-f	VA-5-d	VA-7-b	VA-7-c	VA-7-f	VA-7-g +VA-7-h
Asp		1,18 (1)	2,68 (2)	3,08 (3)		1,95 (2)	1,15 (1)		2,70 (3)
Thr				0,95	1,76 (2)		0,87 (1)	1,70 (2)	1,00 (1)
Ser		1,20 (1)	4,07 (4)			1,03 (1)	0,97 (1)		
Glu		1,18 (1)	1,52 (1)	3,16 (3)	3,08 (3)	1,25 (1)	2,57 (3)	2,85 (3)	2,17 (2)
Pro		0,97 (1)	1,92 (2)	1,25 (1)	0,83 (1)			0,90 (1)	1,00 (1)
Gly		2,00 (2)	5,37 (5)			1,87 (2)	1,18 (1)		1,10 (1)
Ala	1,00 (1)		1,49 (1)	1,09 (1)	1,03 (1)		1,10 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)
Val	0,72 (1)	1,93 (2)	5,34 (5)	1,57 (2)	0,97 (1)	1,20 (3)		1,10 (1)	
Met									
Ile		1,14 (1)	1,46 (1)	1,08 (1)		1,58 (2)	0,97 (1)		
Leu		1,78 (2)	4,02 (4)	3,63 (4)	1,89 (2)	1,02 (1)	1,80 (2)	1,90 (2)	1,82 (2)
Tyr		0,64 (1)							
Phe		0,54 (1)					0,70 (1)		
His	0,51 (1)		2,02 (2)	2,57 (3)	0,89 (1)			0,84 (1)	1,78 (2)
Lys	1,06 (1)	0,85 (1)	1,68 (1)	2,89 (3)	1,72 (2)	1,00 (1)	1,10 (1)	1,13 (1)	2,00 (2)
AA-Cys		0,98 (1)	1,17 (1)				(+)		(+)
Trp									
Arg									
Summe	4	15	29	22	23	13	14	12	16
% Ausb.	6	12	11	6	10	3,5	3	4	7
Mella	M	M	-	(M)	M	-	M	M	M
Böhn	B	B	-	(B)	B	-	B	B	-
Peptid	CTIt4	CTIIt2+3	CTIt4+2	CTIIt4-3	CTIIt5+6	CTIIt4	CTIIt7+8	CTIIt5	CTIIt3

Taf. 4 Fortsetzung

III.4. Diskussion der Vorversuche

Peptide, die auch Mella³⁰⁾ schon isolieren konnte, sind in der Tabelle mit „M“ gekennzeichnet, die von Böhn³³⁾ gefundenen tragen ein „B“. Über die angegebenen hinaus, sind von ihnen keine weiteren Peptide isoliert worden. Beide, Mella und Böhn, gewannen ihre Peptide aus den Überständen der Trichloressigsäure (TCA)-Fällung nach tryptischer Hydrolyse. Die Tabelle zeigt, daß trotz der unterschiedlichen Art der Isolierung, annähernd die gleichen Peptide gewonnen werden konnten. Dieses Ergebnis macht deutlich, daß die Isolierung der tryptischen Peptide der LDH weitgehend ein Löslichkeitsproblem ist. Etwa die Hälfte aller Peptide kann durch Analyse des TCA-Überstandes oder direkt durch Ionenaustauscherchromatographie des Verdauungsansatzes erhalten werden. Die andere Hälfte aber, die große und kleine hydrophobe und deshalb in polaren Lösungsmitteln schwer lösliche Peptide enthält, geht dabei verloren. Um das zu vermeiden, ist der Weg über eine Isolierung der Arginin-Peptide und anschließender Nachverdauung an Lysin- und AÄ-Cystein-Resten unumgänglich.

III.5. Spaltung am Arginin

Auf Grund der Vorversuche wurden folgende Änderungen bei der Modifizierung vorgenommen:

- 1) Um unspezifische Spaltungen zu vermeiden, kam ein affinitätschromatographisch gereinigtes Trypsin für die Hydrolyse zum Einsatz.
- 2) Damit die tryptische Spaltung ausschließlich auf Arginin-Bindungen beschränkt blieb, wurde die „doppelte Citraconylierung“ eingeführt. Die erste

Citraconylierung diente dazu, das Protein bei schwach alkalischem pH löslich zu machen. Sie mußte wegen der schlechten Löslichkeit der AÄ-LDH-M4 in 8 M Harnstoff durchgeführt werden. Eine direkte Citraconylierung war aus dem gleichen Grunde nicht möglich. Nach Gelchromatographie zur Abtrennung des großen Überschusses an Harnstoff und Citraconsäure und nach anschließender Gefriertrocknung ließ sich die LDH leicht in Verdauungspuffer lösen. Unmittelbar vor der tryptischen Hydrolyse wurde zum zweiten Male citraconyliert.

Auch die Verdauungszeit wurde extrem verkürzt. Nach 1 h wurde die Verdauung gestoppt. Dadurch sollten unspezifische Spaltungen durch evtl. noch vorhandene proteolytische Fremdaktivität und durch Nebenspaltungen an möglicherweise doch decitraconylierten Lysinen ausgeschlossen werden.

III.6. Vortrennung der Arginin-Peptide

Der Verdauungsansatz der CT-AÄ-LDH-M4 wurde in 6 Teile aufgeteilt und an Sephadex G 50 F (3x 180 cm, 30%-ige Essigsäure) chromatographiert.

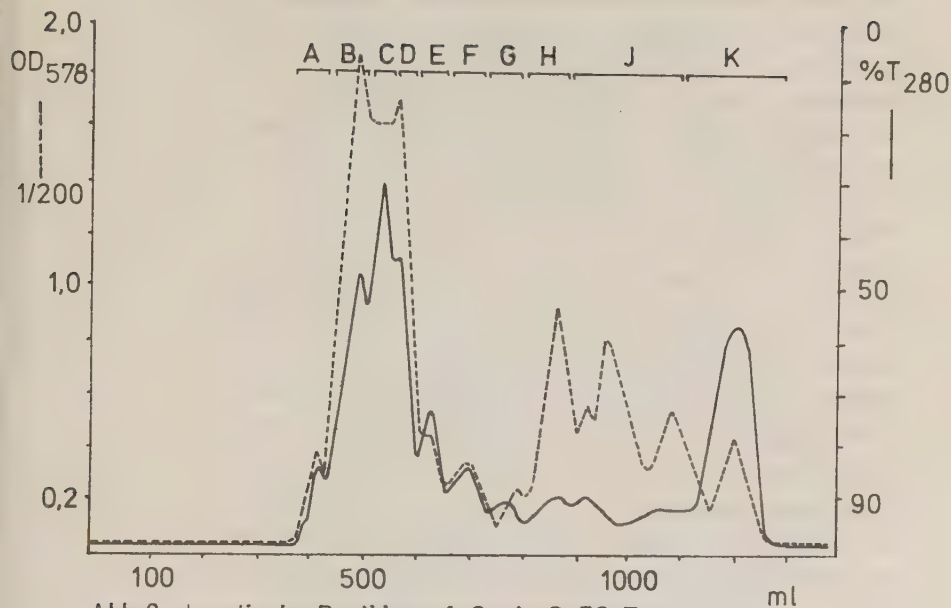


Abb. 8 : tryptische Peptide auf Seph. G 50 F

Die Elutionsprofile der 6 Läufe waren bis auf kleine Abweichungen identisch. Abb. 8 zeigt einen repräsentativen Lauf. Wie im Bild angedeutet, wurde das Material in 10 Gipfel aufgetrennt. Die zu einem Gipfel gehörenden Fraktionen wurden gesammelt und mit A, B, C, ... usw bezeichnet. Von den vereinigten Fraktionen wurden Disk-Elektrophoresen oder Dünnschichtchromatographien auf Kieselgelplatten angefertigt. Peaks, die schon saubere Peptide enthielten, wurden auf ihre

Aminosäurezusammensetzung untersucht. Gipfel A enthielt laut SDS-Disk-Elektrophorese hauptsächlich Trypsin. In Fraktion K fanden sich nach direkter Aminosäureanalyse ohne vorhergehende Hydrolyse 5,3 μMol freies Arginin. Je ein sauberes Peptid war in den Fraktionen D,E,F und G und zu finden. Alle anderen Fraktionen enthielten 2 oder mehr Peptide, so daß weitere Reinigungsschritte notwendig waren.

Die gereinigten Peptide wurden mit CTI, CTII, CTIII, ..., CTXIII bezeichnet, wobei das C für „citronyliert“ und das T für „tryptisch“ stehen soll, und dem Peptid mit dem größten Molekulargewicht die Zahl I, dem mit dem kleinsten die Zahl XIII zuerkannt wurde.

Im Folgenden werden alle Peptide, die durch tryptische Hydrolyse am Arginin bei gleichzeitiger Blockierung der Lysin- und Aminoäthyl-Cystein-Reste entstanden sind, als „Arginin-Peptide“ bezeichnet; darunter fällt auch der Arginin-freie Carboxyl-terminus der LDH.

IV. Isolierung der Arginin-Peptide

IV.1. Isolierung der Peptide CTV-CTXIII

IV.1.a. Die Peptide CT XII und CT XIII

Aus Vorversuchen und aus den Ergebnissen der Arbeiten von Mella war bekannt, daß Trypsin pro Mol Untereinheit LDH-M4 ein Mol Arginin und 1 Mol Phe-Arg freisetzt. Sowohl das Dipeptid als auch das freie Arginin sollten im Salzvolumen der Sephadex-G 50 F Gelchromatographie eluiert werden. Aus diesem Grunde wurde die Fraktion K daraufhin untersucht. Direkte Aminosäureanalyse eines Aliquots der Fraktion ergab $5,3 \mu\text{Mol} \hat{=} 53\%$ freies Arginin.

Nach 20 h - Hydrolyse fanden sich $8 \mu\text{Mol} \hat{=} 80\%$ Phe neben $14 \mu\text{Mol}$ Arg. Der Definition gemäß erhielt das freie Arginin die Bezeichnung CT XIII, das Dipeptid wurde CT XII genannt.

IV.1.b. Die Peptide CT V - CT XI

Bei dünnsschichtchromatographischer Untersuchung der Peaks H und J der Gelchromatographie an Sephadex G 50 F konnten 7 Peptide mit unterschiedlichem R_F -Wert identifiziert werden. Dabei war ein Peptid von Fraktion J mit Ninhydrin nicht anfärbbar. Erst nach Behandlung mit dem Cl/J-Reagenz konnte es im Chromatogramm sichtbar gemacht werden (Abb.9)

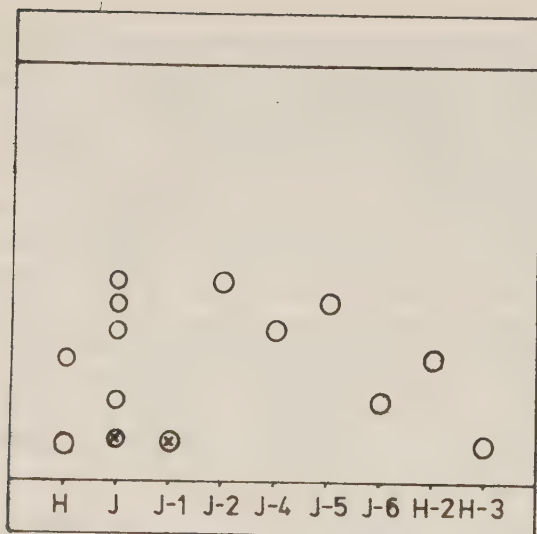


Abb. 9: DC der kleinen Arg-Peptide

○ = Nin. pos.

⊗ = Cl/J pos.

Die Fraktionen H und J wurden per Kationenaustauscherchromatographie an Technicon P (0,1 M Pyridin-Acetat pH 3,1 als Startpuffer) nachgereinigt. Die Elutionsdiagramme sind in Abb. 10 und 11 wiedergegeben.

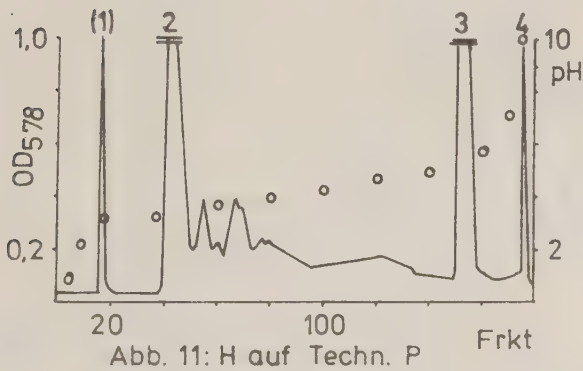
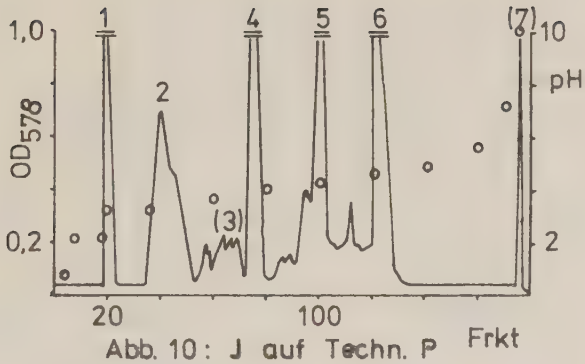


Abb. 10 und 11: Die kleinen Argininpeptide.
Fraktion J und H von Seph
G 50 F auf Technicon P

Frkt	J-1	J-2	J-4	J-5	J-6	H-2	H-3 +H-4
AS							
Asp			1,00 (1)		2,02 (2)	2,02 (2)	3,00 (3)
Thr		0,97 (1)					1,95 (2)
Ser	1,00 (1)						1,89 (2)
Glu	3,80 (4)		1,01 (1)	1,16 (1)	2,02 (2)	2,00 (2)	
Pro						1,06 (1)	
Gly	1,10 (1)	1,20 (1)					0,99 (1)
Ala		2,00 (2)		1,04 (1)	2,01 (2)	1,08 (1)	1,11 (1)
Val		1,15 (2)			0,98 (1)	2,70 (3)	1,02 (1)
Met			0,84 (1)		0,40 (1)	1,00 (1)	1,59 (2)
Ile		0,86 (1)		0,90 (1)		0,82 (1)	
Leu		0,96 (1)	1,70 (2)	0,93 (1)	0,38 (1)	1,78 (2)	0,60 (1)
Tyr				0,90 (1)	0,98 (2)	2,54 (3)	0,92 (1)
Phe							
His							
Lys						0,95 (1)	1,91 (2)
ANcys					0,96 (1)		
Trp							
Arg	1,05 (1)	1,00 (1)	0,95 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	0,83 (1)	0,96 (1)
Σ	7	9	6	6	13	18	17
%Ausb.	59,4	52,2	67,1	66,5	57,3	35,0	52,0
Peptid	CTIX	CT VIII	CTX	CTXI	CTVII	CTVI	CTV
N-term	-	Leu	Leu	Tyr	Val	Ala	Thr

Tab. 2 : AS-Zusammensetzung der tryptischen Peptide
aus den Frkt. H und J nach Reinigung über
Technicon P

Die gereinigten Fraktionen verhielten sich dünnschichtchromatographisch einheitlich. Tabelle 2 zeigt die Summenzusammensetzung der isolierten Peptide mit ihren durch Edman-Abbau ermittelten N-terminalen Endgruppen. Auffallend ist das in Peak J-5 isolierte Peptid, das in seiner Summenzusammensetzung mit dem sogenannten essentiellen Cystein-Peptid der LDH identisch ist. Weiterhin wurde bei dem aus J-1 isolierten Peptid der Summenzusammensetzung Ser, Glu₄, Gly, Arg ein blockierter Aminoterminus gefunden, worauf schon die Ninhydrin-negative Reaktion bei der DC hinwies. Die aminoterminal Blockierung ist auf die Cyclisierung von endständigem Glutamin zu Pyrrolidon-Carbonsäure zurückzuführen. Um den ebenfalls blockierten Aminoterminus der LDH kann es sich hierbei nicht handeln. In meiner Diplomarbeit wies ich ihn als N-Acetyl-Ala nyl-Threonin nach.

IV.2. Die Isolierung von CT IV

SDS-Disk-Elektrophoresen von Peak E ließen ein sauberes Peptid vom Molekulargewicht 4000 erwarten. In der Disk-Elektrophorese bei pH 9,5 wanderte das Peptid zur Kathode und konnte nicht erfaßt werden. Es mußte sich also um ein stark basisches Peptid handeln. Disk Elektrophorese bei pH 4,3 zeigte 3 Banden. Durch Ausschneiden der Banden, anschließende Hydrolyse und Aminosäureanalyse konnte nachgewiesen werden,

Frkt AS	E	E Diskbande	F	F Diskbande	G	G Diskbande	D	D Diskbande1	D Diskbande2	M4BVII
Asp	6,30 (7)	6,98 (7)	4,85 (6)	6,08 (6)	3,90 (4)	4,04 (4)	4,42 (4)	4,60 (4)	4,40 (4)	(4)
Thr	1,33 (1)	1,02 (1)	1,20 (1)	1,30 (1)	1,56 (1)	1,50 (1)	3,50 (4)	3,74 (4)	3,20 (4)	(3)
Ser	3,36 (3)	3,91 (?) ^o	2,27 (2)	3,58 (?) ^o	3,11 (3)	4,44 (?) ^o	4,21 (4)	4,48 (?) ^o	5,06 (?) ^o	(3)
Glu	1,44 (1)	0,43 (1)	1,45 (1)	1,40 (1)	1,56 (1)	1,25 (1)	7,86 (8)	8,10 (8)	7,50 (8)	(8)
Pro	3,40 (4)	3,90 (4)	3,00 (3)	3,10 (3)	2,89 (3)	2,90 (3)	3,07 (3)	3,25 (3)	3,00 (3)	(2)
Gly	2,19 (2)	2,50 (?) ^o	1,45 (1)	2,12 (?) ^o	2,22 (2)	2,86 (?) ^o	4,97 (5)	5,80 (?) ^o	6,12 (?) ^o	(57)
Ala	1,42 (1)	1,30 (1)	1,43 (1)	1,25 (1)	1,52 (1)	1,08 (1)	2,31 (2)	2,80 (2)	2,64 (2)	(2)
Val	4,30 (5) ⁺	5,02 (5)	3,54 (5)	5,07 (5)	2,89 (4)	4,30 (4)	4,45(56)	4,40 (6)	4,60 (6)	(5)
Met							0,87 (1)	0,76 (1)	0,68 (1)	
Ile	4,24 (5) ⁺	4,25 (5)	2,43 (4)	4,12 (4)	1,78 (2)	2,10 (2)	4,81(56)	4,20 (5)	4,52 (5)	(5)
Leu	2,80 (3)	2,88 (3)	3,04 (3)	3,43 (3)	3,10 (3)	3,65 (3)	7,24 (7) ⁺	6,08 (6)	5,96 (6)	(7)
Tyr	1,70 (2)	2,00 (2)	1,73 (2)	2,02 (2)	1,89 (2)	1,67 (2)	1,03 (1)	1,36 (1)	1,08 (1)	(1)
Phe	2,56 (3)	2,94 (3)	1,33 (2)	1,89 (2)	0,65 (1)	0,60 (1)	1,79 (2)	1,70 (2)	1,64 (2)	(2)
His							1,69 (2)	1,58 (2)	1,92 (2)	(1)
Lys	4,45 (5)	4,78 (5)	3,41 (4)	3,60 (4)	2,76 (4)	3,25 (4)	5,70 (6)	4,80 (6)	4,80 (6)	(6)
AA-Cys	1,00 (1)	1,06 (1)	0,86 (1)	1,02 (1)	0,78 (1)	0,72 (1)	0,96 (1)	0,70 (1)	0,80 (1)	(1)
Trp	0,72 (1) [*]						0,74 (1) [*]	1,00 (1)		(1)
Arg	0,61 (1)	1,06 (1)			0,71 (1)	0,65 (1)	0,45		-	(1)
Σ	45		36		31		63			56
%Ausb.	37,8		16,3		24,0		65,0			
Peptid	CTIV	CTIV	CTIV-b	CTIV-b	CTIV-a	CTIV-a	CTIII	CTIII+XIII	CTIII	M4-BVII
N-terminus Asn			Asn		Ile		Val			Ile

⁺ 96h Hydrolyse

^{*}MAS-Hydrolyse

^o s.exp.Teil, Werte nicht zuverlässig

Tab. 3 AS-Zusammensetzung der tryptischen Peptide aus den Fraktionen D, E, F und G

daß die 3 Banden identische Aminosäure-zusammensetzung hatten. Vergleich mit Aminosäureanalysen von Peptidmaterial aus dem Peak E bewies, daß nur ein Peptid vorliegen konnte (Tab.3). Seinem Molekulargewicht entsprechend wurde es mit CT IV bezeichnet. Als aminoterminal Aminosäure wurden Asn ermittelt.

Peak F und G enthielten ebenfalls je ein Peptid. Das Material wurde parallel mit dem von Peak E untersucht, wobei viele Gemeinsamkeiten zwischen dem Peptid CT IV und den Peptiden aus Fraktion F und G festgestellt wurden. In der Disk-Elektrophorese liefen sie kathodisch und die Aminosäureanalyse ergab 3-4 Prolin- und 2 Tyrosinreste sowie das charakteristische Fehlen von Histidin und Methionin. Auch die Gegenwart von Phenylalanin (1-2 Reste) und der geringe Glu-Gehalt (1 Rest) drängte einen Vergleich mit dem Peptid CT IV auf .

Systematischer Vergleich der Aminosäure -zusammensetzung und N-terminale Endgruppenanalyse ergab dann, daß das aus Peak G isolierte Peptid (N-Terminus: Ile) unter Verlust der 11 N-terminalen Aminosäuren aus CT IV hervorgegangen sein mußte, während für das Peptid aus Peak F (N-Terminus:Asn) ein Verlust der 8 c-terminalen Aminosäuren von CT IV festgestellt wurde.

Das Peptid aus Peak G leistete für die Sequenzanalyse wertvolle Dienste, es soll im Folgenden CT IVa genannt werden. Das aus Peak F isolierte Peptid wurde nicht weiter untersucht (CT IVb).

IV.3. Isolierung von CT III

Von dem Peptidmaterial aus Peak D wurden SDS-Disk-Elektrophoresen mit 12,5%-igem Gel bei pH 9,5 angefertigt. Es zeigte sich ein einheitliches Peptid vom Molekulargewicht 6000. Die Aminosäureanalysen der Banden von Disk-Elektrophoresen bei pH 9,5 und 4,3 und des Peptidmaterials von Peak D waren im Rahmen der Fehlergenauigkeit als identisch anzusehen, folglich handelte es sich um ein einheitliches Peptid. Es bekam als drittgrößtes Peptid die Bezeichnung CT III.

Überraschenderweise findet sich in der Aminosäureanalyse regelmäßig ein Arginin-Wert von 0,5. Disk-Bandenanalysen von Elektrophoresen bei pH 4,3 liefen bei identischer Zusammensetzung für die schneller anodisch laufende Bande 1 Arginin-Rest, während die langsamere Bande frei von Arginin ist. Das deutet auf N-terminales Arginin hin, dessen Auftreten nur durch die Existenz einer Arg-Arg-Sequenz zu erklären ist, die schon durch die Isolierung von freiem

Arginin (CT XIII) bewiesen wurde. Auch das Auffinden von nur 53% freiem Arginin findet hier seine Erklärung. N-terminales Arginin wird in Gegenwart von Trypsin sehr viel langsamer abgespalten als carboxylterminales, so daß freies Arginin nur dann entsteht, wenn Trypsin primär C-terminal von der Arg-Arg Sequenz angreift. Da der Angriff statistisch erfolgt, wird nur etwa 50% Arginin freigesetzt, was gut mit dem gefundenen Wert übereinstimmt.

Da das Peptid CT III kein C-terminales Arginin besitzt, handelt es sich hierbei offensichtlich um das carboxyterminale Peptid der LDH-M4. Vergleiche mit dem von H.H. Kiltz sequenzierten carboxyterminalen BrCN-Peptid B VII erhärten diese Vermutung. Dieses besitzt 7 Aminosäuren weniger als das Peptid CT III; im übrigen ist die Summenzusammensetzung weitgehend identisch.

Aus diesem Grunde war auch eine Subfragmentierung von CT III nicht nötig. Im übrigen konnten alle tryptischen Subfragmente des Peptids in den Vorversuchen isoliert werden.

IV.4. Trennung von CT II und CT I

SDS-Disk-Elektrophorese von Proteinmaterial aus Peak B zeigte 2 Peptide, die sich in ihren Molekulargewichten von 7000-8000 nur wenig unterscheiden. Die elektrische Mobilität war auch in den Disk-Elektrophoresen ohne SDS kaum unterschiedlich, sie

Frkt. AS	B Diskbande 1	C Diskbande 2	B-1	B Diskbande 2	B-2	C Diskbande 1	H-2
Asp	6,86 (7)	6,95 (7)	6,82 (7)	7,25 (8)	8,00 (8)	5,67 (6)	(2)
Thr	2,13 (2)	2,04 (2)	1,98 (2)	2,14 (2)	2,00 (2)	2,10 (2)	
Ser	4,52 (?) ^o	5,56 (?) ^o	2,50 (2)	8,38 (?) ^o	7,52 (8)	6,38 (?) ^o	(2)
Glu	8,27 (8)	8,15 (8)	8,20 (8)	6,20 (6)	6,25 (6)	5,80 (6)	(1)
Pro	1,29 (1)	1,05 (1)	1,21 (1)	3,24 (3)	3,16 (3)	3,00 (3)	
Gly	7,20 (?) ^o	8,17 (?) ^o	5,10 (5)	10,50 (?) ^o	8,25 (8)	10,90 (?) ^o	(1)
Ala	5,65 (6)	5,60 (6)	5,72 (6)	5,62 (6)	6,50 (7)	3,75 (4)	(3)
Val	5,99 (6)	6,62 (7)	6,85 (7) ⁺	7,25 (8)	8,25 (9)	6,58 (7)	(1)
Met	3,08 (4)	2,85 (3)	4,45 (5)	2,76 (1)	1,20 (1)		(1)
Ile	3,57 (4)	3,65 (4)	4,82 (5) ⁺	2,71 (3)	3,50 (4)	2,02 (2)	(2)
Leu	8,85 (9)	9,10 (10)	10,40(11)	8,05 (9)	9,50(10)	6,55 (7)	(3)
Tyr				1,72 (2)	1,75 (2)	1,50 (2)	
Phe	0,92 (1)	0,95 (1)	0,94 (1)				
His	3,78 (4)	3,95 (4)	3,30 (4)	4,58 (5)	4,75 (5)	4,25 (4)	
Lys	5,76 (6)	5,92 (6)	5,54 (6)	6,05 (6)	6,50 (7)	5,67 (6)	(1)
AA-Cys	0,60 (1)	0,81 (1)	1,03 (1)	0,67 (1)	1,20 (1)	0,75 (1)	
Trp					3,75 (4) [*]		
Arg	1,00 (1)	0,80 (1)	1,00 (1)	1,1 (1)	1,10 (1)		
Σ			72		86		18
%Ausb.			42		22,0		
Peptid	CTII	CTII	CTII	CTI	CTI	CTI-Cterm	CTVI
N-term.			-		Leu		Ala

Tab. 4 AS.Zusammensetzung der tryptischen Peptide
aus den Fraktionen B und C

⁺96 h Hydrolyse
^o96 h MAS-Hydrolyse
^oWerte nicht zuverlässig,
sh. experimenteller Teil

reichte jedoch zur Erzeugung definierter Banden aus. Erst die Aminosäureanalysen der Disk-Banden (Tab.4) hoben die beiden Peptide deutlich voneinander ab, was sich besonders im Methioningehalt ausdrückt. Während ein Peptid mindestens 4 Methioninreste enthält, wird bei dem anderen nur einer gefunden.

Eine Trennung der beiden Peptide wurde zunächst auf SP Sephadex C 25 (0,6x30 cm) versucht. Mit einem linearen Pyridin-Acetat Gradienten (0,2 nach 2 M) konnte nur ein Peptid wieder vom Harz gelöst werden. Das zweite Peptid widersetzte sich der Elution selbst mit 6 M Pyridin oder 0,5 M NaOH. Aminosäureanalyse eines Aliquots von mit Peptid besetztem Harz und Vergleich mit den Disk-Bandenanalysen zeigte, daß das Peptid mit dem höheren Molekulargewicht auf dem Harz geblieben war. Das isolierte Peptid bekam daher die Bezeichnung CT II. Aminosäureanalysen identifizierten es als das Peptid mit dem hohen Methioningehalt. Es wurden sogar 5 Met-Reste gefunden.

Mit Hilfe eines Stufengradienten von Ameisensäurekonzentrationen zwischen 10 und 100% wurde nun versucht, die beiden Peptide auf Bio-Rex 70 (1,2x10 cm) zu trennen. Dieser Gradient erwies sich bei der Trennung der aminoäthylierten Insulinketten als erfolgreich. Doch ließ sich bei 40% HCOOH nur das Peptid CT II sauber isolieren. Mit

höheren Ameisensäure-Konzentrationen fielen die Peptide CT I und CT II als Gemische an. Eine Kombination der beiden vorangegangenen Methoden ermöglichte endlich die Trennung von CT I und CT II. Durch einen Pyridin-Acetatgradienten (0,2 nach 2M) und anschließender Elution mit konzentrierter Ameisensäure gelang es, die beiden Peptide in reiner Form zu isolieren (Abb.12). Anschließende Aminosäureanalysen stimmten gut überein mit den Analysen der ausgeschnittenen Disk-Banden (Tab.4). Der Gipfel B-1 enthielt das Peptid CT II, der Gipfel B-2 und die mit reiner Ameisensäure eluierten Fraktionen enthielten Peptid CT I.

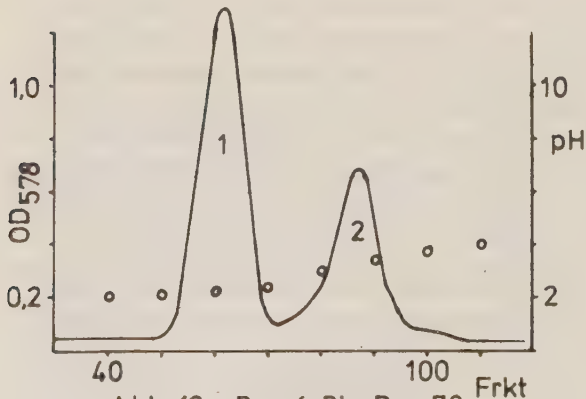


Abb. 12: B auf Bio Rex 70

Abb.12: Rechromatographie der Frkt. B
von Seph G 50 F auf Bio-Rex 70

Vergleiche der Summenzusammensetzungen zwischen dem Peptid CT I und dem in Peak C gefundenen verkürzten Fragment von CT I ergaben überraschenderweise genau die Zusammensetzung von CT VI, so daß angenommen werden konnte, daß das Peptid CT VI das C-terminale Fragment von CT I darstellt. Da CT I nur einen Arginin-Rest besitzt, kann es sich bei dem Peptid CT VI keinesfalls um ein echtes Arginin-Peptid handeln.

IV.5. Bilanz der Arginin-Peptide

Insgesamt konnten 15 Peptide isoliert werden. 13 davon trugen Arginin als carboxyterminale Aminosäure. Aus der Liste der reinen Arginin-Peptide konnte das aus Peak G isolierte Peptid gestrichen werden. Es wurde als das um die 11 aminoterminalen Aminosäuren verkürzte Peptid CT IV identifiziert. Ebenso war es möglich nachzuweisen, daß das Peptid CT VI kein echtes Arginin-Peptid sein konnte. Es wurde als das carboxyterminale Fragment von Peptid CT I erkannt. Die Ausbeutezahlen, die bei 24 bzw. 35% lagen, zeigen, daß diese Peptide nicht auf tryptischen Hauptspaltungsstellen beruhen können. Vielmehr wurde angenommen, daß entweder eine proteolytische Fremdaktivität oder, was wahrscheinlicher ist, eine sequenzabhängige Spaltstelle die Ursache für das Auftreten der angeführten Peptide sein könnte. Gleichfalls auf einen dieser Gründe zurückzu -

	LDH-M4	CTI	CTII	CTIII	CTIV	CTV	CTVII	CTVIII	CTIX	CTX	CTXI	CTXII	CTXIII	Σ CTI-XIII
Asp	32	8	7	4	7	3	2	1		1				32
Thr ^a	12	2	2	4	1	2								12
Ser ^a	22	8	2	4	3	2	2	1	1					22
Glu	30	6	8	8	1			4	1					29
Pro	12	3	1	3	4	1								12
Gly	26	8	5	5	2	1	2	1	1					26
Ala	20	7	6	2	1	1	1	2						20
Val ^b	35	9	7	5-6	5	2	1	2		1				33
Met	8	1	5	1						1				8
Ile ^b	23	4	5	5-6	5	1	1	1						22
Leu	35	10	11	7	3		1	1	2					37
Tyr	7	2		1	2	1			1					7
Phe	7		1	1	3						1			7
His	11	5	4	2										11
Lys	25	7	6	6	5	2								26
AA-Cys	5	1	1	1	1		1							5
Trp	6	4		1	1									6
Arg	11	1	1		1	1	1	1	1	1		1	1	11
Σ	327	86	72	63	45	17	12	9	7	6	5	2	1	326

a) Zerstörung während der HCl-Hydrolyse
b) unvollständige Freisetzung während
der HCl-Hydrolyse

Tab. 5 Tryptische Peptide von CT-AA-IDH-M4

führen ist das aus Peak F isolierte Peptid, das aus CT IV in einer Ausbeute von 16% entstanden ist.

Zieht man die genannten Peptide von der Gesamtzahl der gefundenen ab, so erhält man die in Tab. 5 aufgeführten 12 reinen Arginin-Peptide. Vergleiche der Summenzusammensetzung der einzelnen Peptide und der für jede Aminosäure gefundenen Werte mit der aus Totalhydrolysen gewonnenen Summenzusammensetzung der LDH-M4 ergeben relativ gute Übereinstimmung. Die Werte für Thr und Ser bzw. für Val und Ile können leicht differieren, was auf Zerstörung während der HCl-Hydrolyse bzw. auf unvollständige Freisetzung der Aminosäuren zurückzuführen ist.

Die für die Überlappung von BrCN-Peptiden wichtigen 8 Methionin-Reste verteilen sich wie folgt:

5 Met-Reste befinden sich allein in Peptid CT II.

Je 1 Met-Rest ist in den Peptiden CTI, (CT VI), CT III und CT X zu finden.

Das Vorhandensein von Methionin in CT I und CT VI gleichermaßen beweist, daß der Met-Rest in der Nähe der Carboxylterminus von CT I stehen muß, da CT VI ja 1 Arg-Rest enthält. Der Met-Rest in Peptid CT III steht dagegen an 7.Stelle vom Aminoterminal aus gesehen, denn das BrCN-Peptid BVII ist eben um dieselbe Anzahl Aminosäuren kürzer als das Peptid CT III. Beide repräsentieren

den Carboxylterminus der LDH- M4.
Bis auf die Methionin-haltigen Bereiche in Peptid CT II können alle Met-Peptide durch manuellen Edman-Abbau sequenziert werden. Nach Subfragmentierung und Trennung der entstandenen Peptide steht einer Aufklärung der Sequenz auch um die Met-Reste von CT II nichts mehr im Wege. Auch die Arginin-Peptide CT I und CT IV sollen subfragmentiert werden, da diese Peptide wichtige Teile des aktiven Zentrums enthalten.

V. Subfragmentierung

V.1. Isolierung der tryptischen Peptide von CT IV

Das aus Peak E isolierte Peptid CT IV fiel durch sein ungewöhnliches Verhalten in der Disk-Elektrophorese auf, wo es bei pH 9,5 kathodisch wanderte. Es mußte sich also um ein stark basisches Peptid handeln. Tatsächlich zeigt die Summenanalyse aber ein leichtes Überwiegen von sauren Asp- und Glu-Resten gegenüber basischen Lys- und Arg-Resten. Um trotzdem eine Erklärung für die Basizität zu finden, muß angenommen werden, daß die überwiegende Zahl der gefundenen sauren Aminosäurereste im Peptid als Asparagin und Glutamin vorliegt. Gleichfalls charakteristisch für das Peptid ist das völlige Fehlen von Histidin- und Methioninresten.

Mit seinem AÄ-Cystein-Rest und seinen 5 Lys-Resten sollte das Peptid CT IV sieben tryptische Subfragmente liefern. Die tryptische Hydrolyse wurde auf folgende Weise durchgeführt:

Das Peptidmaterial 15 mg = 3,6 μ Mol wurde in 10ml 0,2 M N-Äthylmorpholinacetatpuffer pH 8,5 (0,3 mM Ca Cl₂, 0,02% NaN₃) aufgeschlämmt und auf 37°C erwärmt. Darauf

wurde 1mg Trypsin zugesetzt (E:S=1:25) und 6 Std. lang verdaut. Anschließend wurde lyophilisiert. Der lyophilisierte Verdauungsansatz wurde in 5 ml 50 proz. HC00H gelöst und auf einer Technicon P-Säule (0,6x50 cm) mit einem Pyridin-Acetat Gradienten (0,2 M - 2M) chromatographiert.

Das Elutionsdiagramm ist in Abb. 13 wiedergegeben.

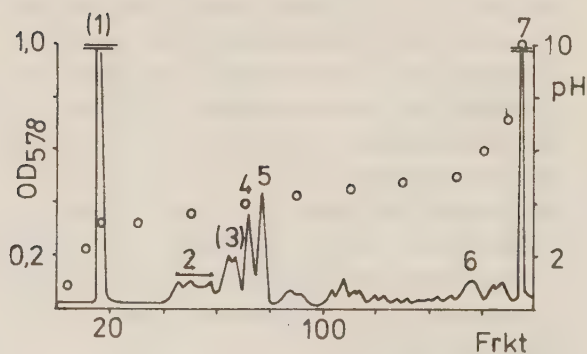


Abb. 13: CTIV, trypt. Pept. auf Techn. P

Dünnschichtchromatographisch einheitliches Material konnte aus den Peaks CT IV-2,-4,-5 und -6 isoliert werden. Nachreinigung von CT IV-1 über Dowex 1x2 brachte keine

	CTIV-2	CTIV-4	CTIV-5	CTIV-6	CTIV-7
Asp	2,16 (2)	1,79 (2)			1,25 (1)
Thr	0,61 (1)				
Ser	1,58 (1)		1,06 (1)		
Glu	1,24 (1)				
Pro	1,26 (1)		1,01 (1)		
Gly	1,35 (1)		1,04 (1)		
Ala	0,85 (1)				
Val	1,08 (2)	0,98 (1)	0,80 (1)	0,38 (1)	
Met					
Ile	0,79 (1)	0,56 (1)		0,35 (1)	
Leu	1,20 (2)				
Tyr	0,78 (1)				
Phe		0,54 (1)	0,81 (1)		
His					
Lys	1,00 (1)	1,00 (1)	0,91 (1)	1,00 (1)	
AKCys					
Trp	(+)				
Arg					1,00 (1)
Σ	16	6	6	3	2
Ausb. %	14,5	12,0	41	16,5	20,0
Peptid	CTIV-t5	CTIV-t1	CTIV-t6	CTIV-t2	CTIV-t7

(c-term)

Tab. 6 tryptische Peptide von CTIV

Die isolierten Peptide sind in Tab. 7 zusammengestellt. Die angegebenen Bezeichnungen der Subfragmente CT II-t₁, CT II-t₂, usw wurden nach dem Einordnen der Peptide in die LDH-Sequenz vorgenommen.

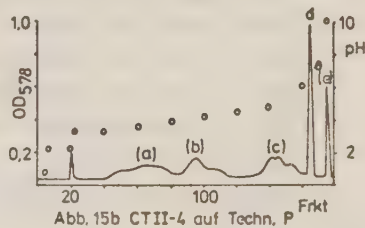
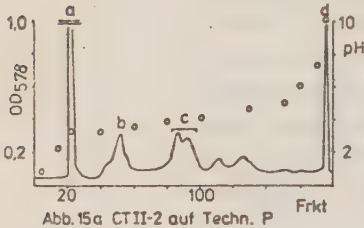
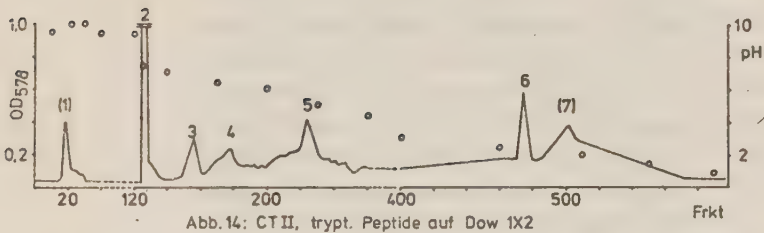


Abb. 14 und 15: Tryptische Subfragmente von Peptid CT II.

Vortrennung der Peptide an Dow 1x2 nach Hilschmann (Säulenmaße 1,5x120 cm) und Rechromatographie von Peak 2 und 4 an Technicon P. Fraktionen in Klammern enthielten nicht trennbare Peptidgemische.

	CTII-2-a	CTII-2-b	CTII-2-c	CTII-2-d	CTII-3	CTII-4-d	CTII-5	CTII-6
Asp	2,20 (2)		1,05 (1)		2,00 (2)	0,97 (1)	1,32 (1)	2,63 (3)
Thr		1,10 (1)						
Ser					1,28 (1)	2,08 (2)	1,18 (1)	
Glu						0,99 (1)	2,38 (2)	2,79 (3)
Pro								
Gly	2,81 (3)						2,11 (2)	
Ala	3,05 (3)	0,97 (1)	1,00 (1)					1,79 (2)
Val	2,82 (3-4)		1,16 (1)			1,18 (1)		1,72 (2)
Met	0,78 (1)	0,72 (1)					1,73 (2)	0,68 (1)
Ile	0,71 (1)	1,50 (2)			0,86 (1)			0,94 (1)
Leu	1,10 (1)	1,23 (1)		0,95 (1)	3,10 (3)		3,01 (3)	1,83 (2)
Tyr								
Phe							0,89 (1)	
His					0,80 (1)	1,93 (2)	1,17 (1)	
Lys	1,16 (1)	0,92	1,18 (1)	1,03 (1)	1,21 (1)	1,00 (1)		1,03 (1)
AA-Cys	1,03 (1)							
Trp								
Arg							0,81 (1)	
Σ	13 + 4	7	4	2	9	8	14	15
Ausb. %	20	36	10	27	26	7	42	18
Peptid	CTII-t1	CTII-t5	CTII-t1	CTII-t7	CTII-t2	CTII-t3	CTII-t8	CTII-t6
+CTII-t4								

Tab. 7 Tryptische Peptide von CTII

Es konnten entsprechend den 6 Lys-Resten und dem AÄ-Cys-Rest 8 Peptide isoliert werden, von denen 4 methioninhaltig sind. Das aus Peak CT II-5 isolierte Peptid ragt mit 2 Methionin-Resten hervor. Es besitzt als basische Aminosäure Arginin und stellt somit das carboxyterminale Peptid von CT II dar. Da kein anderes Peptid mit 2 Met-Resten existiert, muß es sich hierbei um das Peptid mit der Met-Met Sequenz handeln, die durch das Auffinden von freiem Homoserin als BrCN-Fragment sowohl in der LDH-M4 als auch im Herzmuskel-Isoenzym bestätigt worden ist.

Fraktion CT II-1-a enthält 2 Peptide, von denen eines aminoterminal blockiert ist. Dieses konnte durch R_F -Wert und Aminosäureanalysen-Vergleich mit dem BrCN-Peptid B VI-t1 als Aminoterminus der LDH-M4 (Ala, Thr, Leu, Lys) identifiziert werden. Durch Subtraktion dieses Peptides von der Summe beider Peptide folgt das zweite Peptid, das das einzige Subfragment von CT II ist, das AÄ-Cystein als carboxyterminale Aminosäure trägt. Bei der Sequenzanalyse des Gemisches wird nur das aminoterminal nicht blockierte Peptid abgebaut, so daß eine weitere Trennung überflüssig ist.

Das Peptid der Zusammensetzung Ala, Thr, Leu, Lys wurde in der Kationenaustauscherchromatographie von CT II-1 nicht nur im Peak CT II-1-a sondern auch im Peak CT II-1-c gefunden, das heißt, es wurde erst bei pH 4 eluiert. Dieses Verhalten läßt sich nur dadurch erklären, daß hier die den

Aminoterminus blockierende Acetylgruppe fehlt oder daß durch $\bar{N}O$ -shift am Threonin eine Aminogruppe freigeworden und dadurch eine zusätzliche positive Ladung entstanden ist.

V.3. Die tryptischen Peptide von CT I

Das Peptid CT I stellt mit über 80 Aminosäuren das größte tryptische Arginin-Peptid der LDH-M4 dar. Von den anderen Arginin-Peptiden unterscheidet es sich überdies durch die große Zahl von Tryptophan-Resten. Es besitzt 4 der insgesamt 6 Tryptophane der LDH - M4.

In die Reihe der tryptischen Subfragmente von CT I muß auch, wie schon erwähnt, das Peptid CT VI miteinbezogen werden, obwohl es nicht durch Spaltung an einem Lysin-bzw. AÄ-Cystein-Rest hervorging. Von Dungen³⁴⁾ konnte nämlich aus Schweinemuskel-LDH ein tryptophanhaltiges Peptid der Zusammensetzung Asp, Ser₂, Glu, Gly, Ala₃, Val, Met, Ile₂, Leu₂, Lys, Trp isolieren, was dem um Asp, Leu, Arg verminderten und um einen Trp-Rest vergrößerten Peptid CT VI entspricht. Das bedeutet, daß das Peptid CT VI durch Spaltung am Tryptophan entstanden sein muß. Normalerweise deutet das auf chymotryptische Aktivität hin, die jedoch nach affinitätschromatographischer Reinigung des Trypsins nicht mehr vorhanden sein durfte.

Theoretisch sind durch tryptische Nachspaltung von CT I an dem einen AÄ-Cys-Rest und den 7 Lysin-Resten 9 Subfragmente möglich. Die Hydrolyse wurde analog der bei Nachverdauung von CT II angewandten Methode durchgeführt (Enzym: Substrat= 1:30, 37°C, pH 7,5).

Die Hydrolysedauer wurde allerdings auf 4 Std verlängert, um eine möglichst vollständige Verdauung zu erreichen. Wieder wurde das Hydrolysat nach Justieren des pH auf 9,5 auf Dowex 1x2 (1,5x120 cm) gegeben. Das Elutionsdiagramm gibt Abb.16 wieder.

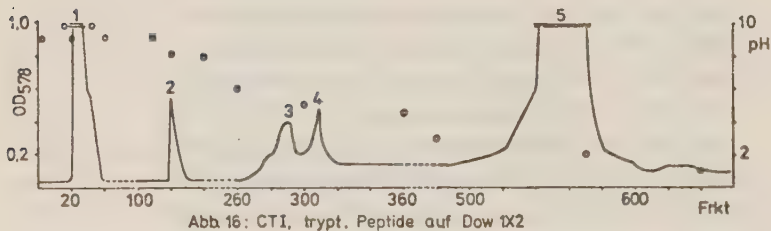


Abb 16: CTI, trypt. Peptide auf Dow 1x2

Dünnschichtchromatographisch einheitlich verhielt sich nur das Material aus Peak CT I-3. Das Material von Peak CT I-1 wurde über Sephadex G 50 F nachgereinigt (Abb.17a).

Im Salzvolumen dieses Laufs wurde ein Tripeptid der Zusammensetzung Asp,Leu, Arg gefunden, der C-Terminus von CT I. 3 weitere Peptide konnten isoliert werden, darunter aus Peak CT I-1-b ein Peptid mit 2 Lysin-Resten.

Drei Peptide fanden sich in Peak CT I-2. Nachreinigung auf Technicon P (Abb.17b) brachte nur die Abtrennung von einem Peptid (CT I-t1). 2 Peptide befanden sich in der NaOH-Fraktion. Sie konnten auf Grund ihrer R_F -Werte in der DC durch Vergleich mit früher isolierten Peptiden als Leu-Lys und Ala,Val,His,Lys identifiziert werden, was voll im Einklang mit der Summenanalyse der Fraktion stand.

Durch Rechromatographie von Peak CT I-4 an Technicon P (Abb. 17c) konnten 2 Peptide gewonnen werden. Die Tatsache, daß ein und dasselbe Peptid in mehreren Peaks gefunden wurde, deutet auf partielle Desamidierung hin, die durch das wiederholte Lösen der Peptide in konzentrierter Ameisensäure nicht zu vermeiden war. Dadurch wurde jedoch eine einwandfreie Trennung der Peptide wesentlich erschwert.

Das Peptidmaterial aus Peak CT-5 wurde über Sephadex G 50 F nachgereinigt (Abb.17d). Dabei stellte sich heraus, daß die Hauptmenge aus ungespaltenem Peptid CT I bestand (Peak CT I-5-a).

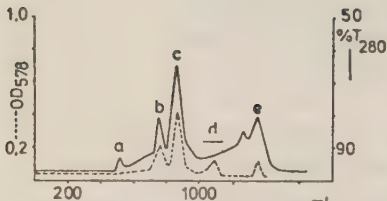


Abb. 17a: CTI-1 auf Seph G 50 F ml

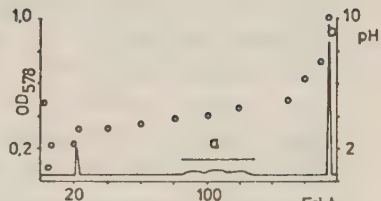


Abb. 17b: CTI-2 auf Techn. P Frkt

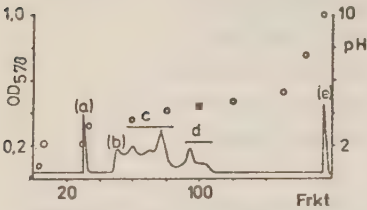


Abb. 17c: CTI-4 auf Techn. P

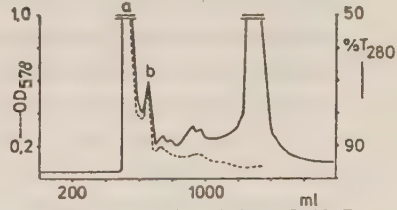


Abb. 17d: CTI-5 auf Seph G 50 F

Abb.17a-d: Subfragmentierung von CT I:
 Rechromatographien der Peaks
 CT I-1 und CT I-5 an Seph G 50 F
 sowie der Peaks CT I-2 und CT I-4
 an Technicon P.

	CT I-1-b	CTI-1-c +CTI-4-c	CTI-1-d +CTI-2-a	CTI-1-e	CTI-2-b	CTI-1-3 +CTI-1-4-d	CTI-5-a	CTI-5-b
Asp	1,90 (2)	1,72 (2)		0,89 (1)		2,78 (3)	7,84 (8)	4,20 (4)
Thr						0,97 (1)	2,10 (2)	1,20 (1)
Ser	3,55 (4)	2,95 (3)	1,04 (1)	0,98 (1)			7,38 (8)	3,17 (3-4)
Glu	1,13 (1)	1,14 (1)				2,20 (2)	7,08 (7)	4,02 (4)
Pro	1,71 (2)	1,07 (1)	1,04 (1)			1,05 (1)	2,24 (2)	0,85 (1)
Gly	4,49 (5)	3,74 (4)	1,20 (1)			1,36 (1)	6,75 (7)	2,83 (3-4)
Ala	1,09 (1)	0,97 (1)			1,00 (1)	1,11 (1)	7,21 (7)	4,12 (4-5)
Val	3,67 (4-5)	3,36 (4)	1,10 (1)		0,85 (1)		7,18 (8-9)	3,08 (3-4)
Met							1,26 (1)	0,95 (1)
Ile	0,78 (1)	0,75 (1)					3,70 (4-5)	1,89 (2-3)
Leu	2,74 (3-4)	1,81 (2)	1,81 (2)		0,90 (1)	2,20 (2)	8,83 (9-10)	4,38 (4)
Tyr							2,15 (2)	1,12 (2)
Phe								
His	1,64 (2)	1,04 (1)	0,61 (1)		0,71 (1)	1,82 (2)	3,37 (4)	1,17 (2)
Lys	1,10 (1)	0,99 (1)			2,18 (2)	1,87 (2)	6,42 (7)	3,70 (4)
AlaCys	0,74 (1)	(+)	0,72 (1)				0,89 (1)	
Trp				1,00 (1)			(+) (+)	(+) (+)
Arg							0,98 (1)	0,86 (1)
Σ	29	22	8	3	2 + 4	15	81	44
%	5	25 +11	28	27,5	2,5	17,5+5	50	12,5
Peptid	CTI-t1+2	CTI-t2	CTI-t1	CTI-t9	CTI-t5	CTI-t3+4	CT I	CTI-t4-8
+CTI-t7								

Tab. 8 Tryptische Peptide von CTI

Trotz homogener Verteilung des Peptids im Verdauungspuffer und trotz verlängerter Verdauungszeit war die tryptische Hydrolyse nur zu 50% erfolgreich gewesen. Neben dem Ausgangsmaterial konnte ein Peptid vom Molgewicht 4000 isoliert werden (CT I-5-b), das 4 Lysine und 1 Arg-Rest enthielt. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht der isolierten Peptide. Die Bezeichnungen CT I-t1 , CT I-t2, CT I-t3, usw. wurden nach dem Einordnen der Peptide in die LDH-Sequenz vorgenommen.

VI. Sequenzanalysen

Sequenzanalysen wurden von den folgenden

Peptiden den mit der manuellen Phenyl-Isothiocyanat-Methode nach Edman durchgeführt.

Peptide aus den Vorversuchen, die miteingesetzt wurden, sind gekennzeichnet. Folgende Symbole werden benutzt, um die Art des Nachweises anzuzeigen:

└ = Edman-Abbau mit Nachweis der PTH-Aminosäuren auf Dünnschichtplatten

└ = Edman-Abbau und anschließend reduktive Rückspaltung mit HCl, Nachweis der AS im Analysator

└└ = Edman-Abbau und Nachweis mit DC und Rückspaltung

└└ = Aminopeptidase-M-Spaltung

VI.1. Peptid CT VI

Sequenz: $\frac{1}{\text{Ala}}$ - $\frac{2}{\text{Ile}}$ - $\frac{3}{\text{Gly}}$ - $\frac{4}{\text{Leu}}$ - $\frac{5}{\text{Ser}}$ - $\frac{6}{\text{Val}}$ -

$\frac{7}{\text{Ala}}$ - $\frac{8}{\text{Asp}}$ - $\frac{9}{\text{Leu}}$ - $\frac{10}{\text{Ala}}$ - $\frac{11}{\text{Glu}}$ - $\frac{12}{\text{Ser}}$ -

$\frac{13}{\text{Ile}}$ - $\frac{14}{\text{Met}}$ - $\frac{15}{\text{Lys}}$ - $\frac{16}{\text{Asn}}$ - $\frac{17}{\text{Leu}}$ - $\frac{18}{\text{Arg}}$

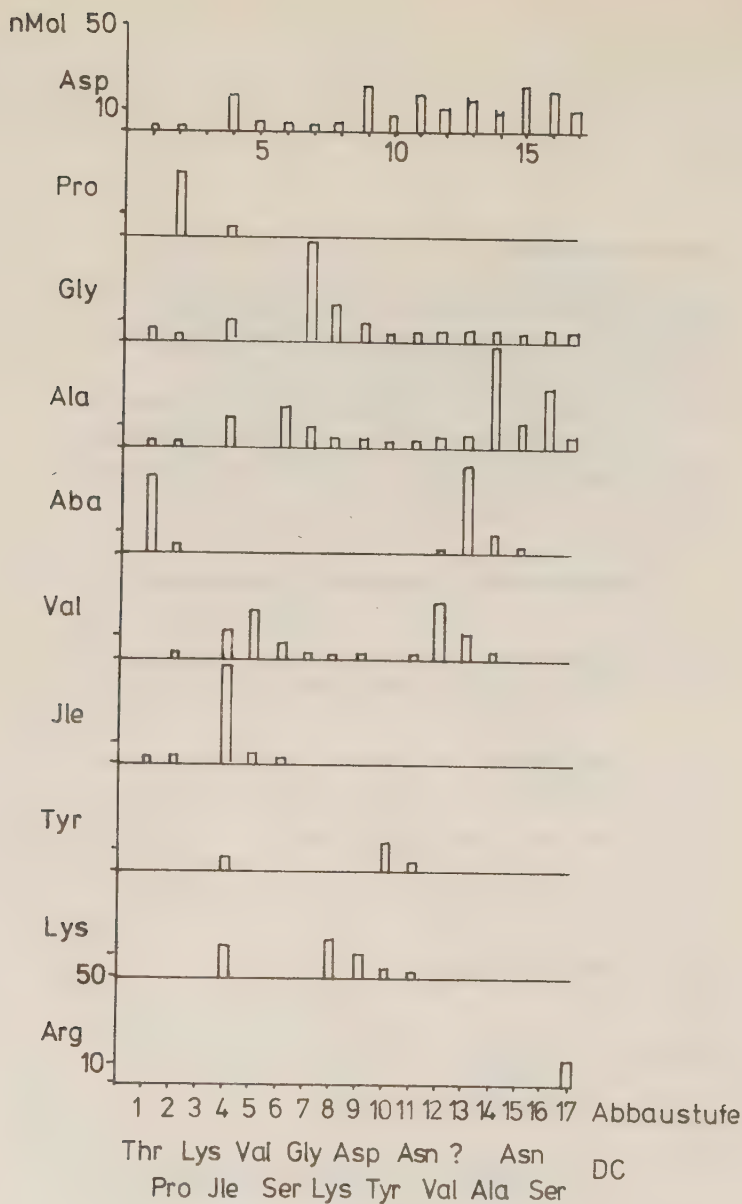


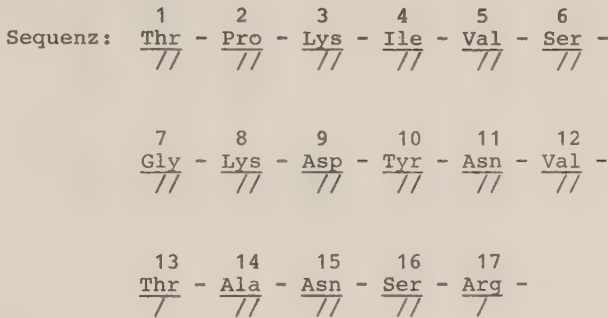
Abb. 18 : Edman-Abbau von CTV

Die letzte Stufe wurde in der Aminosäureanalyse direkt als Arginin bestimmt.

Die Ausbeute an Arginin betrug 4,7%, das sind bei 17 Stufen 85,6% Ausbeute pro Stufe (berechnet nach

Stufenzahl
X = Endausbeute in Anteilen
wenn X=Ausbeute pro Stufe in Anteilen ist).

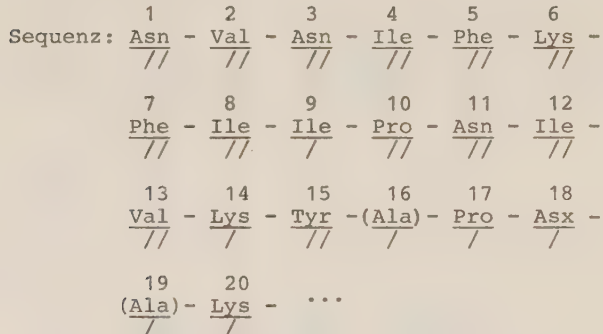
VI.2. Peptid CT V



Der Abbau des Peptids CT V wurde per Rückspaltungsanalysen und damit quantitativ verfolgt. Das in Abb.18 dargestellte Schema zeigt eine deutliche Zunahme des Untergrunds in den letzten Stufen. Dies hat seine Ursache darin, daß die wichtigen Kupplungs- und Abspaltungsschritte nicht quantitativ verlaufen, sondern, wie im Peptid CT VI schon angedeutet, bei der manuellen Edman-Methode bei ca. 85% Ausbeute pro Stufe liegen, so daß eine Aminosäure, die in der n-ten Stufe abgebaut wird (in-step-Wert),

auch in der (n + 1)-ten Stufe in erhöhtem Maße zu finden ist (out-of-step-Wert). Smithies³⁶⁾ et al führten Faktoren ein, mit deren Hilfe der Untergrund korrigiert werden kann in der Form, daß out-of-step-Werte nach Abzug des Basis-rauschens dem in-step-Wert zuaddiert werden.

VI.3. Peptid CT IV



Das Peptid CT IV wurde nicht vollständig sequenziert. Eindeutig bestimmt ist die Sequenz bis Tyr 15 durch DC und Rückspaltungsanalyse. Danach ist nur noch Pro 17 und Lys 20 zweifelsfrei, während zur Identifizierung von Ala 16 und Ala 19 sowie Asx 18 Dünnschichtchromatographien notwendig sind. Nach so vielen Abbaustufen mit der manuellen Edman-Methode ist dies jedoch nicht mehr möglich, da die Menge an abgespalte-ner Aminosäure zu klein wird und der Untergrund zu stark hervortritt. Abb.19 zeigt eine quanti-tative Auswertung der HCl-Rückspaltungsanalysen.

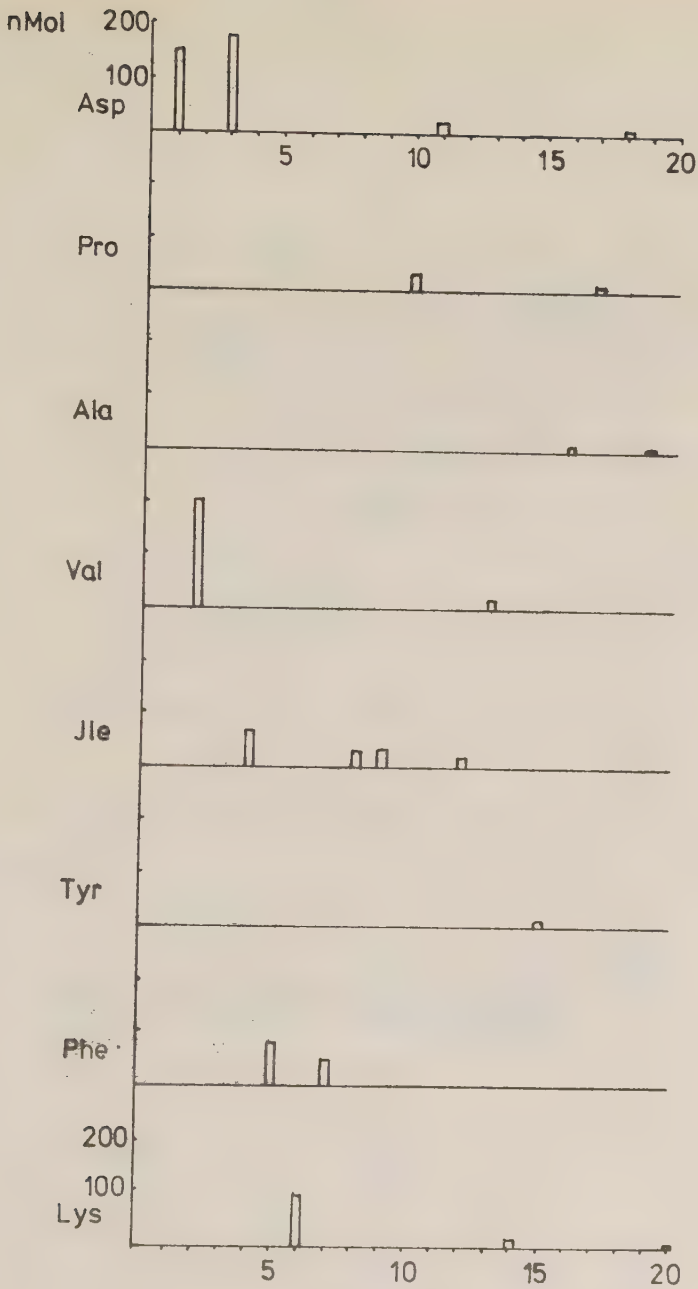


Abb. 19: Edman-Abbau von CTIV
Werte korr. nach Smithies³⁶⁾

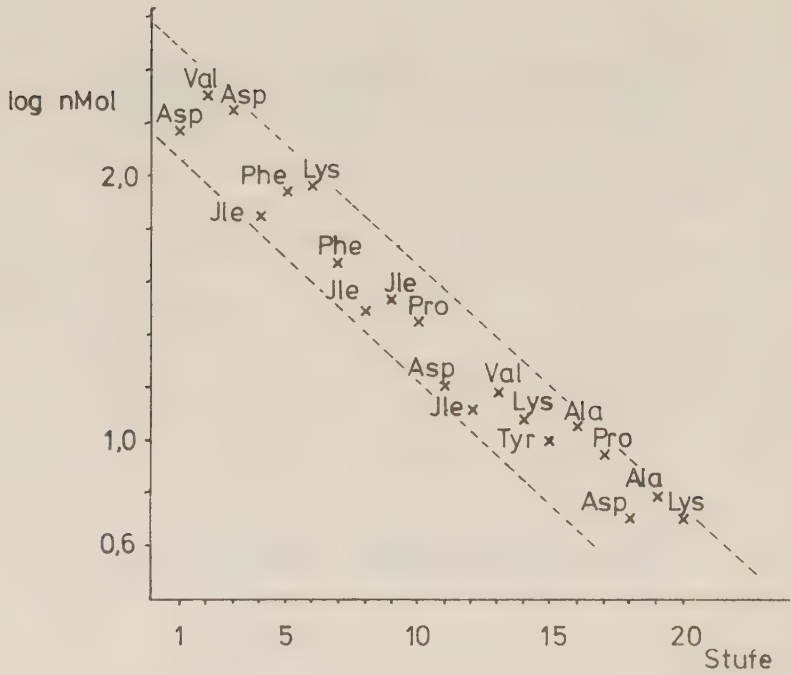


Abb. 20: Edman-Abbau von CTIV

Darstellung der "sequence-box" nach
Smithies³⁶⁾

Die Werte wurden nach der Methode von Smithies et al.³⁶⁾ korrigiert. Durch logarithmisches Auftragen der korrigierten Werte gegen die Stufenzahl ergibt sich ein Diagramm, in dem die in-step-Werte innerhalb der sogenannten „sequence-box“ liegen, die gestrichelt gezeichnet ist. Die Ausbeute pro Stufe berechnet sich hier zu 82%. (Abb.20)

VI.4. Peptid CT IVa

Sequenz: $\frac{1}{//} \text{Ile} - \frac{2}{/} \text{Val} - \frac{3}{//} \text{Lys} - \frac{4}{/} \text{Tyr} - \frac{5}{/} \text{Ser} - \frac{6}{/} \text{Pro} -$
 $\frac{7}{/} \text{Asn} - \frac{8}{/} \text{Cys} - \frac{9}{/} \text{Lys} - \frac{10}{/} \text{Gly} - \frac{11}{/} \text{Glu} - \frac{12}{/} \text{Val} -$
 $\frac{13}{/} \text{Val} - \frac{14}{/} \text{Ser} - \frac{15}{/} \text{Asn}$

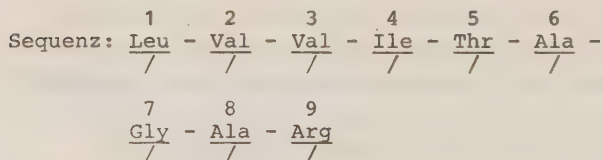
Das Peptid CT IV a konnte wie schon das Peptid CT IV nur ansequenziert werden. Da nur Dünnschichtchromatographien durchgeführt wurden, waren nur 12 Stufen eindeutig zuzuordnen. Die Stufen 13-15 enthielten für eine zweifelsfreie Aussage zu geringe Mengen an Aminosäure.

VI.5. Peptid CT I - t3+4

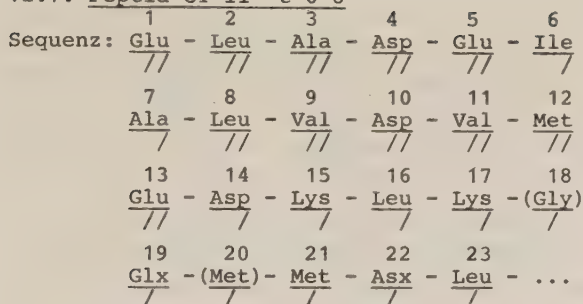
Sequenz: $\frac{1}{\text{Asn}} - \frac{2}{/} \text{Leu} - \frac{3}{/} \text{His} - \frac{4}{/} \text{Pro} - \frac{5}{//} \text{Glu} - \frac{6}{/} \text{Leu} -$
 $\frac{7}{/} \text{Gly} - \frac{8}{/} \text{Thr} - \frac{9}{//} \text{Asp} - \frac{10}{//} \text{Ala} - \frac{11}{//} \text{Asp} - \frac{12}{/} \text{Lys} -$
 $\frac{13}{//} \text{Glu} - \frac{14}{/} \text{His} - \frac{15}{/} \text{Trp} - \frac{16}{/} \text{Lys}$

Das Peptid CT I- t 3+4 stammte aus Fraktionen VA-7-h der Vorversuche. Es enthielt 2 Lys-Reste und wurde deshalb in der ersten Abbaustufe mit Sulfo-PITC gekuppelt. Die aminoterminal Aminosäure und die Lysinreste können wegen des aus der Kupplung mit dem Sulfo-Reagenz resultierenden hydrophilen Charakters mit Chlorbutan nicht mehr extrahiert und im Edman-Abbau daher nicht identifiziert werden. Deshalb wurde das Peptid mit AP-M gespalten und die aminoterminal Aminosäure als Asn ermittelt. Da das Sulfo-PITC nicht quantitativ mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins reagierte, konnte in der 12. Stufe in der DC Lysin identifiziert werden. Aus der Summenzusammensetzung resultiert dann zwangsläufig Lysin für die 16. Stufe.

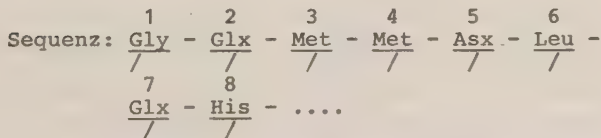
VI.6. Peptid CT VIII



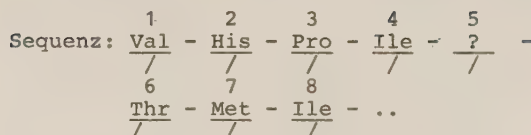
Das Peptid CT VIII wurde ausschließlich per Rückspaltung charakterisiert³⁷⁾. Wie alle kleinen argininhaltigen Peptide war CT VIII eindeutig und in guter Ausbeute (94%!) zu sequenzieren. In Stufe 5 wurde α -Aminobuttersäure (Aba) gefunden.

VI.7. Peptid CT II- t 6-8

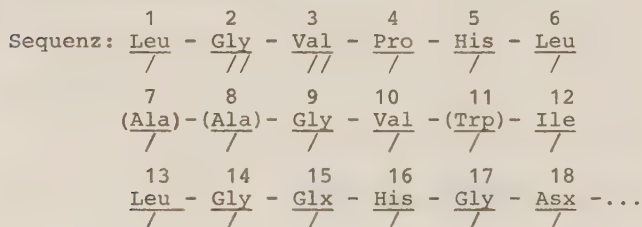
Das Peptid wurde aus Fraktion VA-8-4-b aus den Vorversuchen isoliert. Bis Stufe 17 konnte es mit DC und Rückspaltung eindeutig sequenziert werden, danach wurden wegen der geringen Mengen nur noch Rückspaltungsanalysen durchgeführt. Aus diesem Grunde ist Stufe 19 und 22 nicht sicher zu bestimmen. In Stufe 18 und 20 war die Hydrolysetemperatur zu niedrig und das Ergebnis nicht ganz eindeutig.

VI.8. Peptid CT II- t 8

Das Peptid sollte die Sequenz im Bereich der beiden Methionine sicherstellen. Es wurden deshalb nur 8 Stufen abgebaut.

VI.9. Peptid CT III

Zur Herstellung einer eindeutigen Überlappung zweier BrCN-Peptide, waren nur 8 Stufen von Peptid CT III zu sequenzieren. In Stufe 6 wurde α -Aminobuttersäure gefunden. Die Information von Stufe 5 ging verloren, da zu viel Protein mitextrahiert worden war.

VI.10. Peptid CT I

Das Peptid CT I wurde zum überwiegenden Teil per Rückspaltung sequenziert. Deshalb sind die Stufen 7 und 8 nicht eindeutig zu bestimmen gewesen und in Klammern gesetzt. Ebenso unklar ist der Befund in Stufe 15 und 18. In Stufe 11 wurde wegen erhöhter Werte für Gly und Ala auf Trp geschlossen.

Durch die Existenz des Peptids CT I- t1 konnten auch die Stufen 7 und 8 aufgeklärt werden. Die Summenzusammensetzung dieses Subfragmentes (Ser,Pro,Gly,Val,Leu₂,His,Cys) zeigt,daß für die beiden in Frage kommenden Stufen nur die Aminosäuren Ser und Cys übrig bleiben.

Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Rückspaltungsanalyse, wo beide Aminosäuren als Alanin identifiziert werden. Berücksichtigt man, daß das Peptid CT I-t 1 durch tryptische Spaltung entstanden ist, so bleibt für Stufe 8 nur Cystein, für Stufe 7 dann zwangsläufig Serin. In der Gesamtstruktur ist dies berücksichtigt.

VI.11. Peptid CT XI, AP-M-Zeitstudie

1	2	3	4	5	6
Sequenz : Tyr	- Leu	- Met	- Gly	- Glu	- Arg
—\	—\	—\	—\	—\	—\

Das Peptid CT XI wurde ganz durch Aminopeptidase-M-Spaltung in einer Zeitstudie charakterisiert. Die zu verschiedenen Zeiten gewonnenen Aminosäurereste sind in der Tabelle zusammengestellt:

	<u>10 min</u>	<u>20 min</u>	<u>60 min</u>
Gly	0,10	0,17	0,84
Glu	-	(+)	0,50
Met	0,11	0,73	0,82
Leu	0,62	0,81	0,97
Tyr	1,00	1,00	1,00
Arg	-	-	0,50

VI.12. Folgende Sequenzen ergeben sich
zwingend aus der Summenanalyse
der Peptide

Peptid CT XIII : Arg-Arg
 Peptid CT XII : Phe-Arg 1 2 3 4
 Peptid CT II-t 1 : N-Acetyl-Ala-Thr-Leu-Lys

Da es sich um ein tryptisches Peptid handelt muß Lysin carboxyterminal stehen. N-Acetyl-Ala-Thr wies ich in meiner Diplomarbeit massenspektroskopisch als Aminoterminal der LDH nach. So bleibt für Leu nur die 3.Stelle.

Folgende Sequenzen waren schon bekannt:³⁸⁾

CT VIII : Val-Ile-Gly-Ser-Gly-Cys-Asn-Leu-Asp-Ser-Ala-Arg
 CT IX : Gln-Gln-Glu-Gly-Glu-Ser-Arg
 CT X : Leu-Asn-Leu-Val-Gln-Arg.

VII. Diskussion

VII.1. Fragmentierung und Isolierung der Peptide

Die Aminoäthyl-LDH-M4 vom Schwein besitzt mit 11 Arginin-, 26 Lysin- und 5 AÄ-Cystein-Resten 42 Spaltstellen für die Endopeptidase Trypsin. In Wirklichkeit werden jedoch nicht alle theoretisch möglichen Bindungen hydrolysiert, denn im Verlauf dieser Arbeit konnten viele Peptide mit mehr als einem basischen Rest isoliert werden. Das hatte mehrere Gründe. Zunächst wurde das citraconylierte Protein mit Trypsin nur an den Arginin-Resten gespalten. Das Peptid CT VII trägt daher mit dem AÄ-Cystein einen zusätzlichen basischen Rest. Ebenso enthalten die Peptide CT VI und CT V Lysin-Reste.

Decitraconylierung und tryptische Nachspaltung an den Lysin- und AÄ-Cystein-Resten sollte dann die Arginin-Peptide, die für den manuellen Edman-Abbau zu groß waren, in ihre möglichen Subfragmente zerlegen. Von dem Peptid CT II gelang es auch, alle 8 Bruchstücke zu isolieren. Auch das Peptid CT III dürfte leicht zu subfragmentieren sein, obwohl dies nicht speziell untersucht worden ist; aber die Tatsache, daß in den Vorversuchen alle möglichen 8 Subfragmente isoliert werden konnten, unterstützt diese Annahme.

Die Nachspaltung an den zwei noch fehlenden Arginin-Peptiden CT IV und CT I zeigte dann,

daß in der LDH einige Peptidbindungen existieren, die zwar theoretisch von Trypsin gespalten werden müßten, die aber, wie die Praxis gezeigt hat, entweder nur sehr langsam oder gar nicht hydrolysiert werden. Dies könnte in der Schwerlöslichkeit des Gesamtpeptids seine Ursache haben, das sich als unlöslicher Festkörper der Einwirkung der Protease entzieht. Zwar ist die enzymatische Verdauung in heterogener Phase eine gängige Methode, um so mehr spricht die unvollständige Verdauung für die außerordentliche Schwerlöslichkeit der Peptide. So fiel bei der Isolierung der Subfragmente der genannten Peptide auf, daß bis zu 50% Peptidmaterial gänzlich ungespalten blieb. Eine Hälfte des Peptids CT I konnte nur als Ganzes mit 4 Lysin-Resten isoliert werden, und die Sequenz Asp-Lys-Glu im Peptid CT I - t 3 + 4 wurde reproduzierbar nicht gespalten.

Dies konnte aber nicht einer ungenügenden tryptischen Aktivität zugeschrieben werden, da in allen Fällen auch Peptide in hohen Ausbeuten anfielen.

Um die Verluste bei der Hydrolyse durch ungelöstes Peptidmaterial möglichst gering zu halten, wurde ein Verfahren gewählt, bei dem das zu hydrolysierende Peptid in fein verteilter Form dem Trypsin zugänglich gemacht wurde. Es ist jedoch denkbar, daß während

der Hydrolyse durch Spaltung bestimmter Peptidbindungen ein sehr hydrophobes Fragment freigesetzt wird, das unmittelbar danach ausfällt und nur noch sehr langsam von Trypsin hydrolysiert wird. Diese großen Fragmente werden dann sehr fest an Ionenaustauscher gebunden, was die geringen Ausbeutezahlen erklärt. Kleine hydrophobe Peptide, die durch die unvollständige Spaltung ebenfalls nur in geringen Mengen freigesetzt werden, findet man dann nur äußerst schwer im Eluat des Austauschers wieder. Auch sie werden fest gebunden und nur nach und nach von der Säule eluiert. Manchmal zeigte nur die Unruhe in der Basislinie an, daß ein Peptid eluiert wurde.

Dies sind die Gründe, warum nicht alle Peptide bei der tryptischen Nachspaltung gefunden werden konnten. Dennoch ist es möglich, ein lückenloses Bild der tryptischen Peptide der Schweine-LDH-M4 vom N-zum C-Terminus zu geben, denn durch Sequenzanalyse der ersten 23 Aminosäuren von CT IV konnten die Bereiche der einzigen, nicht isolierten Peptide CT IV-t2, -t3 und t4 überbrückt werden.

Obwohl die unvollständige tryptische Hydrolyse viele Probleme bei der Reinigung komplexer Mischungen großer Peptide aufwarf, sollte bemerkt werden, daß damit auch Vorteile verbunden waren. Denn die Isolierung

von Peptiden mit mehreren Lysin- oder AA-Cystein-Resten lieferte nützliche Überlappungs-peptide und damit wertvolle Informationen für die Ableitung der Gesamtsequenz.

Dazu einige Beispiele:

So konnte aus der Tatsache, daß das Peptid CT III mit und ohne Arginin-Rest aufgefunden wurde, gefolgert werden, daß ihm die einzige Arg-Arg Sequenz der LDH vorausgeht.

Das Peptid CT III-t5, das mit einem und mit zwei Lys-Resten isoliert wurde, lieferte damit den Beweis für eine Lys-Lys-Sequenz. Am interessantesten für die Sequenzaufklärung dürfte jedoch das Peptidfragment CT I-t5-9 sein, da es einen Bereich der LDH umschließt, dessen Subfragmente erfahrungsge-mäß sehr schwer zu isolieren sind.

Durch die Wahl des affinitätschromatographisch gereinigten Trypsins konnten unspezifische Spaltungen auf Grund von chymotryptischer Restaktivität ausgeschlossen werden, wie sie Mella immer wieder erhielt.

So isolierte dieser regelmäßig aus einem tryptischen Verdauungsansatz von LDH-M4 die chymotryptischen Dipeptide Leu-Arg und Ser-Arg. Dennoch spaltete Trypsin die Enzymkette an zwei Stellen, die für die Endopeptidase nicht typisch sind. Einmal die Sequenz Pro-Asn-Ile-Val in Peptid CT IV zwischen Asn und Ile und dann die eigentlich für Chymotrypsin typische Sequenz Trp-Ala in Peptid CT I.

Nicht verschweigen möchte ich jedoch die Vorteile, die aus diesem atypischen Verhalten des Trypsins entstanden sind. Durch die Existenz des um die 11 aminoterminalen Aminosäuren verringerten Peptids CT IV, war es möglich, die Sequenz manuell über 23 Stufen eindeutig zu bestimmen, was wegen der schwierigen Sequenzen (z.B. Ile-Ile, Ile-Val) andernfalls wohl kaum möglich gewesen wäre. Dadurch gelang es, bis in einen Bereich der LDH-Sequenz vorzudringen, an dessen Richtigkeit im Falle der Dornhai-LDH-M4 Zweifel bestehen. Das durch das beschriebene Verhalten des Trypsins entstandene Subfragment CT VI war zweifach von größtem Wert für die Aufklärung der Primärstruktur. Einmal enthält es das einzige Methionin von Peptid CT I und ist somit BrCN-Überlappungspeptid, zum anderen konnte nach Sequenzierung des Peptids festgestellt werden, daß ein Teil von ihm völlig homolog zu einem Sequenzbereich der Dornhai-LDH war, der jedoch an einer ganz anderen Stelle in der Sequenz stand. Dadurch wurde es möglich nachzuweisen, daß bei der Aufstellung der Dornhai-LDH-M4-Sequenz große Peptide nicht richtig zugeordnet sein konnten (siehe Vergleich Primärstruktur Dornhai-Schwein).

VII.2. Die methioninhaltigen Peptide und die Überlappung der BrCN-Peptide

Die vollständige Primärstruktur der Schweine LDH-M4 soll durch die Aminosäuresequenz der BrCN-Peptide und der tryptischen Überlappungs-peptide bewiesen werden. Naturgemäß wurde daher auf die Isolierung und Reinigung methioninhaltiger Peptide größter Wert gelegt. Es war möglich, alle methioninhaltigen Peptide in für die Sequenzanalyse ausreichenden Mengen zu gewinnen. Bis auf zwei wurden alle Peptide sequenziert. Trotzdem gelang die lückenlose Aneinanderreihung der BrCN-Peptide. Zwei von ihnen tragen aminoterminales Lysin, so daß eine Verwechslungsgefahr bestand. Hier konnten jedoch die Vorteile der Citraconylierung ausgeschöpft werden, denn dieses Problem löste sich dadurch von selbst, daß das Peptid CT VI als Pseudo-Arginin-Peptid nicht mit Lysin C-terminal endete, sondern noch die Sequenz Asn-Leu-Arg mitliefert, so daß die Zuordnung zu BrCN-Peptid B4 eindeutig war.

Aus den Sequenzen der methioninhaltigen Peptide ergeben sich für die BrCN-Peptide folgende Überlappungen:

CTII - t6 :-Asp-Val-Met-Glu-Asp-Lys-
 B5 - B3

CTII - t8 :-Gly-Glu-Met-Met-Asp-Leu-Glu
 B3 -B1 - B9

CT X : Tyr-Leu-Met-Gly-Glu-Arg
 B9 -B8

CT VI :-Glu-Ser-Ile-Met-Lys-Asn-Leu-Arg
 B8 - B4

CT III :-Ile- ? -Thr-Met-Ile
 B4 - B7

So fehlen noch die BrCN-Peptide B6 und B2, deren Zuordnung sich jedoch schon aus der Summenzusammensetzung notwendig ergibt. Durch die schon bekannte Sequenz des BrCN-Peptids B2

Ala-Cys-Ala-Ile-Ser-Ile-Leu-HSE

(HSE=Homoserin) konnte ein eindeutiger Zusammenhang zu den isolierten Subfragmenten des tryptischen Peptids CT II hergestellt werden. Das Peptid CT II-t5 weist in seiner Summenzusammensetzung (Ser,Ala,Met,Ile₂,Leu,Lys) einen Ala- und einen Cys-Rest weniger und einen Lys-Rest mehr auf als BrCN-Peptid B2. Das Subfragment CT II-t4 ist das einzige Met-haltige Peptid mit einem Cys-Rest als c-terminale Aminosäure. Da dies das einzige Cystein im Peptid CT II ist, folgt zwangsläufig, daß es mit dem Cystein in BrCN-Peptid B2 identisch sein muß. Das beweist eindeutig, daß das BrCN-Peptid B6 vor B2 stehen muß und somit das aminoterminal BrCN-Peptid der LDH-M4 darstellt. Dies wird dadurch bestätigt, daß es als einziges BrCN-Peptid aminoterminal blockiert ist.

So stellt sich für die Reihenfolge der BrCN-Fragmente der Schweine LDH-M4 folgendes Gesamtbild:

Acetyl-NH-B6-B2-B5-B3-B1-B9-B8-B4-B7-COOH.

VII.3. Die Primärstruktur der LDH

Durch die Überlappung der BrCN-Peptide wurde es möglich, auch die Reihenfolge der tryptischen Peptide festzulegen. Sie lautet:

Acetyl-NH-CTII-CTV-CTVIII-CTIX-CTIV-CTVII-
CTXII-CTXI-CTI (incl. CTVI)-CTXIII-CTIII-COOH

Da einerseits 56% der Aminosäuresequenz durch Sequenzierung der tryptischen Peptide gewonnen wurde (3 kleine Arg-Peptide waren schon bekannt), andererseits durch bereits vorliegenden Sequenzen der BrCN-Peptide weitere 37% dazukamen, kann nun ein vorläufiges Bild der Primärstruktur der Schweine-LDH-M4 gezeichnet werden (Abb.21). Die noch unbekannten 7% der Sequenz wurden durch Homologiebetrachtungen mit schon bekannten Sequenzen der Schweine-LDH-H4 (deren Primärstruktur ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe bearbeitet wird und gleichfalls kurz vor der Aufklärung steht), sowie mit der Primärstruktur der Dornhai-LDH-M4 auf Grund der Summenzusammensetzungen der für die Bereiche in Frage kommenden Peptide in ihrer Aminosäurefolge wie angegeben postuliert. Dazu muß bemerkt werden, daß der Bereich von Aminosäurerest 138 bis 149 weniger sicher angegeben werden kann als der Bereich von Sequenz Nr. 231-241, da sich diese Angaben lediglich auf einen Sequenzteil von Nr. 236 bis 250 der Dornhai-LDH-M4 berufen, der mit der Summenzusammensetzung des genannten Bereichs in der Schweine-LDH-M4 gut übereinstimmt. Vom Aminosäurerest 231 bis 241 lag die Sequenz von BrCN-Peptid

1	5	10	15
Ac-Ala-Thr-Leu-Lys, <u>Asp</u> , <u>Gln</u> , <u>Leu</u> , <u>Ile</u> , <u>His</u> , <u>Asn</u> , <u>Leu</u> , <u>Leu</u> , <u>Lys</u> , <u>Glu</u> , <u>Glu</u> ,			
16	20		30
His, Val, Pro, His,	<u>Asn</u> , <u>Lys</u> , <u>Ile</u> , <u>Thr</u> , <u>Val</u> , <u>Val</u> , <u>Gly</u> , <u>Val</u> , <u>Gly</u> ,		
31			45
<u>Ala</u> , <u>Val</u> , <u>Gly</u> , <u>Met</u> , <u>Ala</u> , <u>Cys</u> , <u>Ala</u> , <u>Ile</u> , <u>Ser</u> , <u>Ile</u> , <u>Leu</u> , <u>Met</u> , <u>Lys</u> , <u>Glu</u> , <u>Leu</u> -			
46			60
<u>Ala</u> - <u>Asp</u> - <u>Glu</u> - <u>Ile</u> - <u>Ala</u> - <u>Leu</u> - <u>Val</u> - <u>Asp</u> - <u>Val</u> - <u>Met</u> - <u>Glu</u> - <u>Asp</u> - <u>Lys</u> - <u>Leu</u> - <u>Lys</u> -			
61			75
<u>Gly</u> - <u>Glx</u> - <u>Met</u> - <u>Met</u> - <u>Asx</u> - <u>Leu</u> - <u>Glx</u> - <u>His</u> , <u>Gly</u> , <u>Ser</u> - <u>Leu</u> , <u>Phe</u> , <u>Leu</u> , <u>Arg</u> , <u>Thr</u> -			
76			90
<u>Pro</u> - <u>Lys</u> - <u>Ile</u> - <u>Val</u> - <u>Ser</u> - <u>Gly</u> -	<u>Lys</u> - <u>Asp</u> - <u>Tyr</u> - <u>Asn</u> - <u>Val</u> - <u>Thr</u> - <u>Ala</u> - <u>Asn</u> -		
91			105
<u>Ser</u> - <u>Arg</u> , <u>Leu</u> - <u>Val</u> - <u>Val</u> - <u>Ile</u> - <u>Thr</u> - <u>Ala</u> - <u>Gly</u> - <u>Ala</u> - <u>Arg</u> , <u>Gln</u> - <u>Gln</u> -	<u>Glu</u> -		
106			120
<u>Gly</u> - <u>Gln</u> - <u>Ser</u> - <u>Arg</u> , <u>Leu</u> - <u>Asn</u> - <u>Leu</u> - <u>Val</u> - <u>Gln</u> - <u>Arg</u> , <u>Asn</u> - <u>Val</u> - <u>Asn</u> - <u>Ile</u> - <u>Phe</u> -			
121			135
<u>Lys</u> - <u>Phe</u> - <u>Ile</u> - <u>Ile</u> - <u>Pro</u> - <u>Asn</u> - <u>Ile</u> - <u>Val</u> - <u>Lys</u> - <u>Tyr</u> - <u>Ser</u> - <u>Pro</u> - <u>Asn</u> - <u>Cys</u> - <u>Lys</u> -			
135a			150
<u>Leu</u> , <u>Leu</u> - <u>Val</u> , <u>Val</u> , <u>Ser</u> , <u>Asn</u> , <u>Pro</u> , <u>Leu</u> , <u>Asp</u> , <u>Val</u> , <u>Leu</u> , <u>Thr</u> , <u>Tyr</u> , <u>Leu</u> , <u>Ala</u> , <u>Trp</u> ,			
151			165
<u>Lys</u> , <u>Phe</u> , <u>Ser</u> , <u>Gly</u> , <u>Ile</u> , <u>Pro</u> , <u>Lys</u> , <u>Asn</u> , <u>Arg</u> , <u>Val</u> - <u>Ile</u> - <u>Gly</u> - <u>Ser</u> - <u>Gly</u> - <u>Cys</u> -			
166			180
<u>Asn</u> - <u>Leu</u> - <u>Asp</u> - <u>Ser</u> - <u>Ala</u> - <u>Arg</u> , <u>Phe</u> - <u>Arg</u> , <u>Tyr</u> - <u>Leu</u> - <u>Met</u> - <u>Gly</u> - <u>Glu</u> - <u>Arg</u> , <u>Leu</u> -			
181			195
<u>Gly</u> - <u>Val</u> - <u>His</u> - <u>Pro</u> - <u>Leu</u> - <u>Ser</u> - <u>Cys</u> , <u>Gly</u> - <u>Val</u> - <u>Trp</u> - <u>Ile</u> - <u>Leu</u> - <u>Gly</u> - <u>Glx</u> - <u>His</u> -			
196			210
<u>Gly</u> - <u>Asx</u> , <u>Ser</u> , <u>Val</u> , <u>Pro</u> , <u>Ser</u> , <u>Val</u> , <u>Trp</u> , <u>Ser</u> , <u>Gly</u> , <u>Leu</u> , <u>Val</u> , <u>Asn</u> , <u>Ala</u> , <u>Lys</u> ,			
211			225
<u>Asn</u> - <u>Leu</u> - <u>His</u> - <u>Pro</u> - <u>Glu</u> - <u>Leu</u> - <u>Gly</u> - <u>Thr</u> - <u>Asp</u> - <u>Ala</u> - <u>Asp</u> - <u>Lys</u> - <u>Glu</u> - <u>His</u> - <u>Trp</u> -			
226			240
<u>Lys</u> , <u>Ala</u> , <u>Val</u> , <u>His</u> , <u>Lys</u> , <u>Glu</u> , <u>Val</u> , <u>Val</u> , <u>Asp</u> , <u>Ser</u> , <u>Gly</u> , <u>Tyr</u> , <u>Glu</u> , <u>Val</u> , <u>Ile</u> ,			
241			255
<u>Lys</u> , <u>Leu</u> , <u>Lys</u> , <u>Gly</u> , <u>Tyr</u> , <u>Thr</u> , <u>Asp</u> , <u>Trp</u> - <u>Ala</u> - <u>Ile</u> - <u>Gly</u> - <u>Leu</u> - <u>Ser</u> - <u>Val</u> - <u>Ala</u> -			
256			270
<u>Asp</u> - <u>Leu</u> - <u>Ala</u> - <u>Glu</u> - <u>Ser</u> - <u>Ile</u> - <u>Met</u> - <u>Lys</u> - <u>Asn</u> - <u>Leu</u> - <u>Arg</u> , <u>Arg</u> - <u>Val</u> - <u>His</u> - <u>Pro</u> -			
271			285
<u>Ile</u> - <u>Ser</u> - <u>Thr</u> - <u>Met</u> - <u>Ile</u> , <u>Lys</u> , <u>Gly</u> , <u>Leu</u> , <u>Tyr</u> , <u>Gly</u> , <u>Ile</u> , <u>Lys</u> , <u>Glu</u> , <u>Asn</u> , <u>Val</u> ,			
286			300
<u>Phe</u> , <u>Leu</u> , <u>Ser</u> , <u>Val</u> , <u>Pro</u> , <u>Cys</u> , <u>Ile</u> , <u>Leu</u> , <u>Gly</u> , <u>Gln</u> , <u>Asn</u> , <u>Gly</u> , <u>Ile</u> , <u>Ser</u> ,			
301			315
<u>Asp</u> , <u>Val</u> , <u>Val</u> , <u>Lys</u> , <u>Val</u> , <u>Thr</u> , <u>Leu</u> , <u>Thr</u> , <u>Pro</u> , <u>Glu</u> , <u>Glu</u> , <u>Glu</u> , <u>Ala</u> , <u>His</u> , <u>Leu</u> ,			
316			330
<u>Lys</u> - <u>Lys</u> , <u>Ser</u> , <u>Ala</u> , <u>Asp</u> , <u>Thr</u> , <u>Leu</u> , <u>Trp</u> , <u>Gly</u> , <u>Ile</u> , <u>Glu</u> , <u>Lys</u> , <u>Glu</u> , <u>Leu</u> , <u>Gln</u> ,			
<u>Phe</u> -C00H			

Abb. 21: Die Aminosäuresequenz der LDH-M4 vom Schwein unterstrichen sind homologe Sequenzen mit der Dornhai-LDH-M4¹⁴⁾ unterstrichelt sind Homologien mit der umge-
stellten Dornhai-LDH-M4-Sequenz

B8 der LDH-H4 vor, nach der die Aminosäurefolge von Peptid CT I - t5-8 analog gesetzt wurde. In der Abbildung sind alle aus tryptischen Peptiden ermittelten Sequenzen einschließlich der 3 schon bekannten Sequenzen durch Bindestriche gekennzeichnet.

Wo die Aminosäurefolge auf anderen Informationen beruht, sind die einzelnen Aminosäuren durch Kommata getrennt. Die Nummerierung wurde in Analogie zur Sequenz der Dornhai-LDH-M4 durchgeführt. Es sei bemerkt, daß die dort festgelegten Leerstellen in den Positionen 21,82,104 und 300 auch in die Schweine-LDH-M4-Sequenz mit übernommen wurden. Bei der Aufstellung der Sequenz wurde eine zusätzliche Leerstelle in Position 20 festgestellt.

VII.4. Das aktive Zentrum der LDH

Durch die Aufstellung der Primärstruktur der Schweinemuskel-LDH ist es nun auch möglich, einen Blick in die Regionen der Sequenz zu werfen, die das sogenannte „aktive Zentrum“ der LDH ausmachen. Um sich eine Vorstellung von den räumlichen Verhältnissen machen zu können, soll im Folgenden ein kurzer Abriss über die bereits vorliegenden Informationen in diesem Bereich der Tertiärstruktur der Dornhai-LDH-M4 gegeben werden. Gleichzeitig soll versucht werden, diejenigen Probleme deutlich zu machen, die von der Primärstruktur in der vorliegenden Form nicht beantwortet werden können.

In engstem Zusammenhang mit der Sequenzanalyse stand seit je her die Frage nach dem aktiven Zentrum der LDH.

Mit Hilfe von chemischen Modifizierungen reaktiver Aminosäureseitenketten des katalytischen Bereichs gelang der Nachweis je eines essentiellen Cystein-⁶⁾ Tyrosin⁷⁾- und Histidinrestes⁸⁾. Nach tryptischer Hydrolyse wurden Peptidfragmente isoliert, die die unmittelbare sequenzielle Nachbarschaft der essentiellen Aminosäuren aufklären halfen^{8,9,10)}. Auch von der Modifizierung von essentiellen Arginin-Resten¹¹⁾ und einem Lysin-Rest¹²⁾ wurde berichtet.

Da man aber annehmen muß, daß die für die katalytischen Eigenschaften notwendigen Aminosäuren in der Sequenz weit von einander entfernt liegen und nur durch die besondere räumliche Anordnung der Polypeptidkette zu Nachbarn werden, konnten diese Informationen nur zu Spekulationen über den Wirkungsmechanismus des Enzyms führen. Die Kenntnis der räumlichen Anordnung der Aminosäuren durch eine sinnvolle Kombination der Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse¹³⁾ und der Aminosäuresequenz der Dornhai-LDH-M4¹⁴⁾ vermochte dann einen vorläufigen Einblick in die Funktion der Katalyse zu liefern. Danach scheinen bei der LDH aus dieser Spezies wirklich nur 2 Aminosäuren so lokalisiert zu sein, daß sie die komplizierten Ladungsverschiebungen bei der Katalyse ermöglichen (Abb.22)

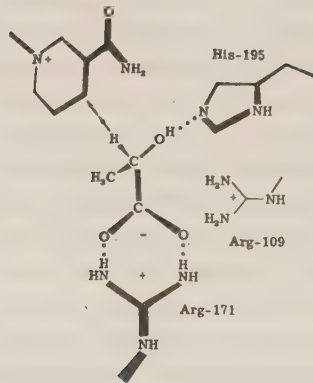


Abb. 22 Die Lage des Substrats im aktiven Zentrum der LDH (aus Boyer, The Enzymes XI, 243⁴⁴).

Alle anderen als „essentiell“ bezeichneten Aminosäuren dienen lediglich zur Stabilisierung des ternären Komplexes.

Abb. 23 zeigt die Bindungsverhältnisse im ternären Komplex nach den von S.S. Taylor¹⁴⁾ und M.G. Rossmann¹³⁾ ermittelten Werten.



Abb. 23 Bindungsverhältnisse im ternären Komplex der LDH (aus Boyer, The Enzymes, XI, 240⁴⁴⁾).

Die Tasche, die dem Coenzym und dem Substrat zur Einlagerung zur Verfügung steht, gliedert sich deutlich in zwei Hälften. Die eine nimmt das Adenosin auf, während das Nicotinamid, mit dem Adeninteil durch die Diphosphatbrücke verbunden, zusammen mit dem Substrat die andere Hälfte besetzen. Über die Öffnung legt sich im ternären Komplex die sogenannte „loop“ der LDH, um Lösungsmiteleinflüsse fernzuhalten¹³⁾.

Die Lage des Coenzym und des Substrats wird durch die in Abb. 23 angegebenen Wasserstoffbrücken und zusätzlich durch Wechselwirkungen mit hydrophoben Aminosäuren im aktiven Zentrum fixiert. Am Modell der Dornhai-LDH-M4, das im hiesigen Institut nach den kristallographischen Daten der 2,0 Å Auflösung gebaut wurde³⁹, kann man die Anhäufung von hydrophoben Aminosäureresten besonders im Adenin-Bindungsbereich sehr deutlich erkennen. Der die Aminosäuren 21-165 umfassende Coenzym - Bindungsbereich zeichnet sich durch eine ganz spezielle Kombination von Sekundärstrukturelementen aus. Sechs β -Faltblattstrukturen und vier α -Helices sind im Wechsel um das Coenzym gruppiert. An dem NAD zugewandten Wendepunkten zwischen den β -Faltblattstrukturen und den α -Helices sind die für die Coenzymbindung wichtigen Aminosäuren lokalisiert, z.B. Asp 30 und 53, Lys 58, Tyr 85, Arg 101 und Glu 140. Der Coenzymbindungsbereich ist durch die angeführten Sekundärstrukturelemente stark quervernetzt. Er stellt eine vom Substratbindungs-

bereich fast völlig getrennte Domäne dar. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen beiden Bereichen gibt es so gut wie nicht. Auf der Substratbindungsseite liegen nur drei essentielle Aminosäuren, nämlich Arg 171, His 195 und Lys 250. Während das Arginin durch Ladungsausgleich mit der Carboxylgruppe des Pyruvats das Substrat in die richtige Lage zwischen der einzigen an der Redoxreaktion direkt beteiligten Aminosäure His 195 und dem Nicotinamid bringt, hat man Lys 250 wegen seiner unmittelbaren Nachbarschaft zu der Carboxylgruppe des Nicotinamids Stützfunktionen zugesprochen.

Die Frage nach der Rolle des essentiellen Cystein-Restes bei der Katalyse scheint mit der Ermittlung der dreidimensionalen Struktur beantwortet zu sein. Durch seine unmittelbare Nachbarschaft zum aktiven Zentrum der LDH muß die Modifizierung des Cystein-Restes 165 eine sterische Behinderung bei der Ausbildung des ternären Komplexes darstellen, die bis zur totalen Hemmung des Enzyms führen kann⁴⁰⁾. Jeckel⁴¹⁾ konnte zeigen, daß die nahezu unveränderte Aktivität bei der Modifizierung durch kleine Reste wie CH_3Hg^+ oder $-\text{CN}$ darauf hindeutet, daß alle möglichen Komplexe der LDH mit NADH und Pyruvat gebildet werden. Er schreibt dem Cystein-Rest regulatorische Eigenschaften bei der Pyruvatbindung zu.

Die Rolle der essentiellen Aminosäuren, wie sie Abb.23 angibt, ist jedoch nicht völlig zweifelsfrei. So soll der Lysinrest 250 durch seine H-Brückenbindung zum Nicotinamid für die A-Seitenspezifität der NAD^+ -Reduktion⁴⁰⁾ verantwortlich sein. Intensive Untersuchungen an der Elektron-Dichte-Karte der Dornhai-LDH-M4 gaben jedoch keinen Hinweis auf einen Lysin-Rest in Position 250⁴³⁾

Dem Aminosäurerest 140, der in der Dornhai-LDH-M4 als Glutaminsäure angegeben ist, ordnet die Röntgenstrukturanalyse einen Platz im Abstand von $4,4 \text{ \AA}$ vom Nicotinamid zu. Dies veranlaßte zu der Interpretation, daß ein Ladungsausgleich zwischen der Carboxylgruppe des Glu-Restes und dem Pyridinstickstoff des Nicotinamidringes stattfinden kann, wenn dieser in der oxidierten Form als NAD^+ vorliegt. Demnach müßte NAD^+ besser gebunden werden als NADH , was in Wirklichkeit umgekehrt ist. Das veranlaßt Holbrook und Rossmann⁴⁴⁾ einlenkend zu bemerken: „The 400 fold better binding of NADH over NAD^+ is not well understood in terms of structure at this time“.

Ungeklärt blieb bis jetzt ebenfalls die Frage nach dem essentiellen Aminosäureseitenrest der LDH mit einem pK um 9,5, der für die Dissoziation des binären Enzym- NADH -Komplexes verantwortlich ist⁴¹⁾. Der pK-Wert trifft für die Dissoziation einer phenolischen Hydroxylgruppe zu. Ein Tyr-Rest wurde von Jeckel¹⁰⁾ in der LDH-H4 vom Schwein mit diazotierter (S^{35}) Sulfanilsäure nach reversibler Blockierung der freien SH-Gruppen mit Hg Cl_2 modifiziert.

Über das isolierte und zum Teil sequenzierte tryptische Tyrosin-Peptid schreiben Holbrook und Rossmann⁴⁴⁾:

"By comparison with the dogfish-LDH sequence the labeled tyrosine corresponds to residue 220. However this tyrosine is nowhere near to the active center of the subunit. It is most improbable that it can be associated with catalysis".

Dagegen zeigte Jeckel⁴¹⁾ eindeutig, daß eine undissoziierte phenolische Hydroxylgruppe für die binäre Komplexbildung erforderlich ist. Durch Fluoreszenzmessungen an binären Nitro-LDH-NADH-Komplexen gelang ihm der Nachweis, daß der modifizierte Tyrosinseitenrest in der Nähe der NADH-Bindungsstelle liegen muß.

Abgesehen vom aktiven Zentrum der Dornhai-LDH bestehen in zwei anderen Bereichen der Sequenz Zweifel an der Richtigkeit der Primärstruktur. So schreiben Holbrook und Rossmann von Unstimmigkeiten zwischen Sequenz und kristallographischen Daten im Bereich der Aminosäurereste 134-145 und 186-189 .

VII.5. Peptide mit essentiellen Aminosäuren

Wie im vorigen Kapitel erwähnt wurde, ist die Existenz eines tryptischen Peptides der LDH mit einem essentiellen Cystein-Rest schon lange bekannt und seine Sequenz fast ebenso lang aufgeklärt⁹⁾. Seit der Veröffentlichung

der Dornhai-LDH-M4-Sequenz ist auch bekannt, daß es sich bei dem essentiellen Rest um Cys-165 handelt. Eben dieses Peptid wurde auch in der Schweine-LDH-M4-Sequenz an der gleichen Stelle als Peptid CT VII gefunden. Mit dem Arginin-Rest 171 befindet sich eine zweite essentielle Aminosäure in diesem Peptid. Wie in Abbildung 21 dargestellt, dient ihre Guanidino-Gruppe zum Ladungsausgleich der Carboxylgruppe des Substrates und damit seiner Fixierung im aktiven Zentrum.

Ein zweites Peptid mit einer essentiellen Aminosäure ist ebenfalls schon länger bekannt. Woenckhaus et al.⁸⁾ konnten nach Modifizierung eines essentiellen Histidin-Restes in der Schweine-LDH-H4 aus dem tryptischen Verdauungs-hydrolysat ein Peptid isolieren, dessen Sequenz mit der aus dem Bereich Nr.191-203 der Dornhai-LDH-M4-Sequenz übereinstimmt. Bei dem essentiellen Histidin handelt es sich also um den Aminosäurerest 195.

In der Schweine-LDH-M4 findet sich an der gleichen Stelle ebenfalls ein Histidin-Rest mit der gleichen sequenziellen Umgebung wie sie das essentielle Histidin im Woenckhaus-Peptid aufweist. Auch dieser Bereich wurde durch die Sequenzierung des tryptischen Peptids CT I aufgeklärt.

Die lange ungeklärte Frage nach einer vierten essentiellen Aminosäure in der LDH, die Jeckel¹⁰⁾ durch Untersuchungen am H4-Isoenzym einem Tyrosin-Rest zugeschrieben hat, kann

durch die Isolierung des tryptischen Subfragmentes CT I - t5-8 endlich positiv beantwortet werden. Durch seine in Analogie zu dem BrCN-Peptid B8 angeordneten Aminosäuren, die unter anderem auch die Sequenz des sequenzierten Peptids CT VI einschließen, wird der Position 237 ein Tyrosin-Rest zugeordnet, der dem von Jeckel isolierten essentiellen Tyrosin-Rest in seiner sequenziellen Umgebung gleichkommt. Erst kürzlich konnte Jeckel aus einem peptischen Verdauungsansatz von LDH-H4 nach Modifizierung des essentiellen Tyrosins ein Dipeptid der Zusammensetzung Tyr, Glu⁴⁵ isolieren, was die Sequenz um den Tyrosin-Rest 237 bestätigt. Da es in der gesamten LDH-H4 keine weitere Tyr-Glu oder Glu-Tyr-Sequenz mehr gibt ist dies ein weiterer Beweis dafür, daß es sich bei dem essentiellen Tyrosin-Rest um Tyr 237 handelt. Betrachtet man die in Frage kommende Stelle am Modell, so sieht man, daß dieser Rest tatsächlich Teil des aktiven Zentrums sein muß. Exakte Aussagen über die Natur der Wechselwirkungen des essentiellen Tyrosins sind jedoch erst möglich, wenn die genauen Röntgenstrukturdaten vorliegen. Die Dornhai-LDH-M4 hat an dieser Stelle einen Valin-Rest und auch in der Nachbarschaft findet sich kein Tyrosin. Seltsamerweise fehlt die dem essentiellen Tyrosin benachbarte Sequenz, wie sie in der Schweine-LDH-M4 und H4 gefunden worden ist, in der Dornhai-LDH-M4 nicht völlig, sie befindet sich nur an einer ganz anderen Stelle, nämlich um den Aminosäurerest 220 herum, der

ebenfalls von einem Tyrosin eingenommen wird. Die Gegend der Sequenz liegt weit vom aktiven Zentrum, und man kann sich kaum vorstellen, daß der Tyr-Rest bei der Katalyse eine Rolle spielen soll. Jedoch es wäre auch denkbar, daß dieser Bereich um den Tyrosin-Rest 220 herum in der Dornhai-LDH nicht an der richtigen Stelle steht. Dieser Frage soll in einem gesonderten Kapitel nachgegangen werden, in dem die Gesamtsequenzen der Schweine- und der Dornhai-LDH-M4 miteinander verglichen werden.

VII.6. Peptide mit anderen wichtigen Aminosäuren

In der Abbildung 22, die die Bindungsverhältnisse im ternären Komplex der LDH zeigt, sind neben den essentiellen Aminosäuren His 195 und Arg 171 sieben Aminosäuren eingezeichnet, denen die Röntgenstrukturdaten wichtige Funktionen bei der Ausbildung des ternären Komplexes zuschreiben. Es sind dies zur Fixierung des Coenzym die Aminosäuren: Asp 30, Asp 53, Lys 58, Tyr 85, Arg 101, Glu 140 und Lys 250.

Vier der angeführten Aminosäuren finden sich auch in der Sequenz der Schweine-LDH-M4 an identischen Positionen. Es sind dies im

Peptid CT II- t6 Asp 53 und Lys 58, im Peptid CT V Tyr 85 und im Peptid CT VIII Arg 101. Drei der angegebenen Aminosäuren sind in der Sequenz der Schweine-LDH-M4 nicht vorhanden. So ist in Position 30 an Stelle von Asp ein Valin zu finden und auch im benachbarten Sequenzbereich kein Asp vorhanden.

Der Glu-Rest in Position 140 kann ebenfalls als nicht existent in der Schweine-LDH-M4 angesehen werden. Wahrscheinlich steht an dieser Stelle ein Asn. Glutaminsäure kann aber auf jeden Fall ausgeschlossen werden, da der einzige Glu-Rest von CT IV in Position 136 steht. Bei Betrachtung des dreidimensionalen Modells der LDH kommt eine Einwirkung dieses Glutaminsäure-Restes auf das Coenzym nicht in Frage.

Könnte das Fehlen von Asp 30 noch als weniger bedeutend eingestuft werden, da ja ohnehin der Lysin-Rest 58 eine H-Brücke zur Adenosin-Ribose ausbildet, so muß das Fehlen des als sehr wichtig bezeichneten Restes Glu 140 als gravierend angesehen werden. Die Deutung der Funktion von Glu 140, das sich ja nicht durch die H-Brücke zur Nicotinamid-Ribose auszeichnet, sondern dessen Carboxylgruppe mit dem Pyridinstickstoff des Nicotinamid-ringes in Wechselwirkung treten kann, wenn dieser in der oxidierten Form als NAD^+ vorliegt, war aber keineswegs frei von Zweifeln. So konnte keine Erklärung dafür gegeben werden, warum trotz der beschriebenen Wechselwirkungen zum

NAD^+ , die reduzierte Form NADH 400-mal besser gebunden wird als die oxidierte. Ein Fehlen des Glutaminsäurerestes an dieser Stelle, wie es in der Schweine-LDH-M4 tatsächlich der Fall ist, würde dem Ergebnis sehr entgegenkommen. Die letzte in der Reihe der wichtigen Aminosäuren ist der Lysin-Rest in Position 250. Dieser soll mit seiner ϵ -Aminogruppe eine Wasserstoff-Brückenbindung zur Carboxylgruppe des Nicotinamids ausbilden und so für die richtige Lage des Pyridinringes im aktiven Zentrum sorgen. Man hat ihm deshalb die Verantwortung für die A-Seitenspezifität bei der Hydridübertragung zugesprochen. Sequenzanalyse und Einordnung des Peptids CT VI ergab jedoch, daß die Position 250 in der Schweine-LDH-M4 mit Ile besetzt ist und daß auch keine der benachbarten Aminosäuren einen geladenen Seitenrest tragen. Damit fehlt eine zweite, für die katalytische Funktion mit wichtigen Aufgaben bedachte Aminosäure in der Schweine-LDH-M4. Wiederum sind starke Unterschiede in den Primärstrukturen der beiden LDH-Sequenzen aufgedeckt worden. Man kann sich kaum vorstellen, daß Aminosäurereste, die im Dornhai-Enzym eine wichtige Rolle spielen, im Enzym vom Schwein fehlen sollen. Der Gedanke, daß im Fall der Dornhai-LDH-M4 Sequenzen falsch zugeordnet worden sein könnten, wurde ja schon bei der Diskussion um das essentielle

Tyrosin erwähnt, und es erscheint nicht abwegig, wenn darin der Grund für die großen Diskrepanzen zu suchen wäre. Im nächsten Kapitel soll deshalb besonders auf die Frage eingegangen werden.

VII.7. Vergleich der Primärstruktur der LDH-M4 von Schwein und Dornhai

Bei der Betrachtung der Primärstruktur der LDH-M4 von Schwein und Dornhai fallen drei große Bereiche sofort ins Auge. Diese umfassen

- a) Sequenzen großer Übereinstimmung mit einzelnen Punktmutationen,
- b) Sequenzen mit hoher Austauschquote und
- c) Sequenzen, die keinerlei Verwandtschaft miteinander aufweisen.

Fast identisch sind die Sequenzen im Coenzym-Bindungsbereich von Aminosäurerest Nr.22 bis 129, wo vorwiegend α -Helices und β -Faltblattstrukturen die Sekundärstruktur bestimmen. Ebenso fällt die sog. „loop“ (AS-Rest 98-106) in diesen Bereich. Identisch sind in beiden Sequenzen ebenfalls die Bereiche um das essentielle Cystein (AS-Rest Nr.161-182) sowie um den essentiellen Histidin-Rest 195 (AS-Rest 193-204). Auch dieser Bereich wird durch α -Helices und β -Faltblattstrukturen bestimmt.

Auffallend ist, daß meistens Aminosäuren an den Übergängen von einer Sekundärstruktur in die andere ausgetauscht sind. Dies ist dadurch erklärlich, daß den Aminosäuren an den erwähnten Übergängen keine Funktionen in Hinsicht auf Stabilisierung der Sekundär- oder Tertiärstruktur abverlangt werden. Die oben erwähnten, für die Bindung des Coenzym's wichtigen Aminosäuren, die ebenfalls an diesen Übergängen postiert sind, fallen alle noch in Bereiche, in denen beide Primär - strukturen übereinstimmen. Bereiche mit höherer Austauschquote (ca. 50%) befinden sich an beiden Enden der Enzymkette. Diese beiden Bereiche bilden in ihrer Sekundärstruktur eine Besonderheit. Der Aminotermius ragt mit seinen ersten 20 Aminosäuren aus einer Untereinheit heraus und stellt mit diesem „Arm“ den Kontakt zur benachbarten Untereinheit im Tetramer her. Dabei liegt der größte Teil des Arms an der Oberfläche des Enzyms. Ebenfalls an der Oberfläche befindet sich der gesamte carboxylterminale Bereich in Form einer großen α -Helix. Auch hier ist der nach außen zeigende Teil der Helix ohne intramolekulare Funktion, so daß die hohe Austauschquote nicht verwundert. Es wird also im allgemeinen in Bereichen der Sequenz, die an der Oberfläche liegen, eine weniger große Übereinstimmung gefunden als bei Sequenzen im Inneren

der Enzyme.

Völlig ohne Übereinstimmung sind die Sequenzbereiche von Aminosäurerest 134-149 als auch von 211-252 sowie von 183-189, obwohl die Röntgenstrukturdaten für die Sekundärstruktur sowohl α -Helices als auch β -Faltblattstrukturen angeben, und die Bereiche im Inneren des Enzyms liegen müssen. In diesen Sequenzen enthalten sind auch die umstrittenen Aminosäuren Glu 140 und Lys 250, die, trotz der ihnen zugeschriebenen wichtigen Funktion, in der Sequenz der Schweine-LDH-M4 fehlten. Intensive Studien an der Dornhai-LDH-M4-Sequenz und den tryptischen und den BrCN-Peptiden der Schweine-LDH kamen zu dem Ergebnis, daß etliche Sequenzen in der Primärstruktur des Dornhai-Enzyms mit großer Wahrscheinlichkeit falsch zugeordnet sind. So fand sich eine geradezu frappierende Ähnlichkeit zwischen dem sequenzierten tryptischen Peptid CT II - t3+4 (AS-Rest 211-226) der Schweine-LDH-M4 und der von Sequenz-Nr.136-151 angegebenen Aminosäurefolge in der Dornhai-LDH. Daraufhin stieß man auf folgende weitere Homologien (Abb.24) :

Dornhai-LDH-M4	Schweine-LDH-M4
214-235	231-252
236-250	137-151

137	140	
S-M4:	Val, Val, Ser, Asn, Pro, Leu, Asp, Val, Leu, Thr, Tyr, Leu, Ala, Trp, Lys	150
236	240	
D-M4:	Val-Val-Ser-Asn-Pro-Val-Asp-Val-Leu-Thr-Tyr-Val-Ala-Trp-Lys	250
211	215	220
S-M4:	Asn-Leu-His-Pro-Glu-Leu-Gly-Thr-Asp-Ala-Asp-Lys-Glu-His-Trp-Lys	225
136	140	145
D-M4:	Glu-Leu-His-Pro-Glu-Leu-Gly-Thr-Asp-Lys-Asn-Lys-Glu-Asp-Trp-Lys	150
227	230	
S-M4:	Ala, Val, His, Lys	
211	213	
D-M4:	Leu-His-Lys	
231	237	240
S-M4:	Asp, Val, Val, Glu-Ser, Ala, Tyr, Glu, Val, Ile, Lys, Leu, Lys, Gly, Tyr,	245
214	220	
D-M4:	Asp-Val-Val-Asp-Ser-Ala-Tyr-Glu-Val-Ile-Lys, Leu-Lys-Gly-Tyr-	228
246	250	
S-M4:	Thr, Asp, Trp-Ala-Ile-Gly-Leu-	
229	235	
D-M4:	Thr-Ser-Trp-Ala-Ile-Gly-Leu	

Abb. 24 Gegenüberstellung homologer Sequenzen aus

Dornhai (D-M4) - und Schweinemuskel (S-M4)-LDH

Das Peptid Ala-Val-His-Lys Nr. 227-230 von der Schweinemuskel-LDH fand sich in der Dornhai-LDH nur als Fragment Leu-His-Lys (Nr.211-213) wieder. Die entsprechenden Sequenzen zu Ile-Leu-Lys (Nr. 134-135a) sowie Gly-Cys (Nr.251-252) aus der Dornhai-Sequenz konnten in der Schweinemuskel-LDH-Sequenz nicht gefunden werden. Die auf Grund der Umstellung der Sequenzen in der Dornhai-LDH sich neu ergebenden Homologien sind in Abb.21 gestrichelt eingezeichnet.

Die neuen Erkenntnisse an der Primärstruktur der LDH haben auch schon ihr erstes Echo. W.Eventoff⁴⁶⁾, der an der Röntgenstrukturanalyse der Schweineherz-LDH arbeitet, teilte uns mit, daß die aus der Umstellung resultierende Primärstruktur ausgezeichnet mit den Elektronendichtedaten harmonisiere und fügte hinzu, daß mit einer angenommenen Deletion am Rest Nr.210, alle Sequenzen der Dornhai-LDH in die richtige Reihenfolge gebracht werden können. Ganz neu ist auch die Mitteilung von Susan S.Taylor⁴⁷⁾, daß sie ebenfalls die Primärstruktur der Dornhai-LDH-M4 gemäß unseren Ergebnissen umgestellt hat.

Die Erkenntnis, daß weite Teile der Dornhai-Sequenz falsch zugeordnet worden sind, bleibt nicht ohne Konsequenzen. Die auf diesen In-

formationen beruhende Vorstellung von den Abläufen bei der Katalyse und den räumlichen Verhältnissen im aktiven Zentrum der LDH muß neu überdacht werden. Dabei wird der essentielle Tyrosin-Rest die ihm zukommende Rolle spielen. Gleichzeitig werden die bis jetzt als wichtig angesehenen Reste Glu (140) und Lys (250) bedeutungslos. Im Falle des Glutaminsäure-Restes ist ein Entfernen aus dem aktiven Zentrum sogar erwünscht, da er einer Vorstellung, die das Experiment erklärte (nämlich die 400-mal bessere Bindung von NADH gegenüber NAD^+), hinderlich war. Dagegen wird ein Ersatz für den Lysin (250)-Rest, der die A-Seitenspezifität der Hydridübertragung erklären half, mit großem Interesse verfolgt werden. Möglicherweise nimmt diese Stelle der essentielle Tyrosin-Rest ein, indem er mit dem Pyridinring des NADH eine aromatische Wechselwirkung eingeht.

Eine abschließende Antwort auf diese Frage wird erst dann gegeben werden können, wenn die kristallographischen Daten der Röntgenstrukturanalyse von der Schweine-LDH vorliegen und mit der ermittelten Primärstruktur verglichen werden.

Z u s a m m e n f a s s u n g

- 1) LDH-M4 vom Schwein wurde aminoäthylisiert, citraconyliert und tryptisch verdaut.
- 2) Die 12 an den Argininen gespaltenen Peptide konnten isoliert werden.
- 3) 2 Peptide entstanden durch Spaltung an anderen, nicht basischen Aminosäuren, eins vermutlich durch Spaltung an einem Lys-Rest.
- 4) Die Peptide CT I, CT II und CT IV wurden tryptisch subfragmentiert, die entstandenen Peptide weitgehend isoliert.
- 5) Alle Met-haltigen Peptide konnten isoliert werden.
- 6) Sechs der 8 Met-haltigen Peptide wurden sequenziert. Damit konnten alle BrCN-Peptide überlappt und in eine eindeutige Reihenfolge gebracht werden.
- 7) Die aus tryptischen Subfragmenten sequenzierten Peptide machten 56% der Gesamtsequenz aus.

- 8) Mit Hilfe der sequenzierten Teile sowie durch Homologiebetrachtungen der nicht sequenzierten mit Sequenzen von Dornhai-LDH-M4 als auch von Schweine-LDH-H4 war es möglich, ein vorläufiges Bild der Primärstruktur der Schweinemuskel-LDH zu geben.
- 9) Ein Vergleich zwischen den Primärstrukturen von Dornhai-LDH-M4 und Schweine-LDH-M4 wurde durchgeführt. Dabei wurde erkannt, daß Teile der Dornhai-Sequenz mit großer Wahrscheinlichkeit falsch zugeordnet wurden.
- 10) Nach Umstellung von drei großen Bereichen der Dornhai-Sequenz, die zum Teil das aktive Zentrum der LDH entscheidend beeinflussen, wurde weitgehende Übereinstimmung der beiden Primärstrukturen erreicht.

Literaturnachweis

- 1) G.Pfleiderer, Vitamins and Hormones 28, 195 (1970)
- 2) R.Jaenicke und S.Knof, Eur.J.Biochem. 4, 157 (1968)
- 3) E.Apella und C.Markert, Biochem.Biophys.Res.Comm. 6, 171 (1961)
- 4) Th.Wieland und G.Pfleiderer, Angew.Chemie Int.Ed. Engl. 1, 196 (1962)
- 5) R.D.Cahn, N.O.Kaplan, L.Levine und E.Zwilling SEL (Wash) 136, 962 (1962)
- 6) S.F.Velick, J.Biol.Chem. 233, 1455 (1958)
- 7) G.Pfleiderer, C.Woenckhaus, D.Jeckel und K.Mella, in „Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases" (H.Sund, ed.) S. 145, Springer Verlag, Berlin und New York 1970
- 8) C.Woenckhaus, J.Berghäuser und G.Pfleiderer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem., 350, 473 (1969)
- 9) J.J.Holbrook, G.Pfleiderer, K.Mella, M.Valz, W.Lescowac und R.Jeckel, Eur. J.Biochem. 1, 476 (1967)
- 10) G.Pfleiderer und D.Jeckel, Eur.J.Biochem. 2, 171 (1967)
- 11) J.Berghäuser und I.Falderbaum, Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 352, 1189 (1971)
- 12) S.S.Chen und P.Engel, Biochem. J. 149, 107 (1975)
- 13) M.J.Adams, G.C.Ford, P.J.Lentz jr., A.Liljas und M.G. Rossmann Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1793 (1973)
- 14) S.S.Taylor, S.S.Oxley, W.S.Allison und N.O.Kaplan Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70, 1790 (1973)
- 15) M.A.Raftery, R.D.Cole, Bioch.Biophys.Res.Comm., 10, 467 (1963)
- 16) M.Z.Atassi und A.F.S.A. Habebbb, Methods in Enzymology, Vol. XXV, 546 f, Acad.Press New York (1972)
- 17) K.D.Jany, W.Keil, H.Meyer und H.H.Kiltz, BBA, zur Veröffentlichung eingereicht
- 18) H.Ponstingl, H.J.Braun, M.Hess und N.Hilschmann, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 195 (1972)
- 19) M.S. Roseblatt, M.N.Margolies, L.E.Cannon und E. Haber, Anal.Biochem. 65, 321 (1975)
- 20) S.Moore und W.Stein, J.Biol.Chem. 211, 907 (1954)
- 21) R. und A. Clotten „Hochspannungselektrophorese", 137, G.Thieme Verlag (1962)

- 22) H.Rydon und P.Smith, Nature, 169, 922 (1952)
- 23) L.L. Houston, Anal.Biochem. 44, 81 (1971)
- 24) P.Edman, Acta Cehm.Scand., 10, 761 (1956)
- 25) H.Tamura und N.Ui, J.Biochem. (Tokyo) 71, 543 (1972)
- 26) H.R. Maurer, „Disk-Elektrophorese“, de Gruyter Verlag, Berlin (1968)
- 27) U.Femfert und G.Pfleiderer, FEBS Letters 8,65,(1970)
- 28) W.Keil und H.H.Kiltz, Veröffentlichung in Vorbereitung
- 29) S.B. Needleman, „Protein Sequence Determination“
S. 137 f, Springer Verlag Berlin,Heidelberg, New York
(1970)
- 30) K.Mella, private Mitteilung
- 31) P.J.G.Butler und B.S. Hartley,Methods in Enzymology,
Vol. XXV, 191 f, Acad.Press, New York und London(1972)
- 32) H.J.Torff, Vortrag, Gesellschaft f.biol.Chem.,München
(1976)
- 33) P.Böhn, Diplomarbeit,Frankfurt/Main (1967)
- 34) A.v.Dungen, Diplomarbeit, Frankfurt/Main (1969)
- 35) R.E. Humbel, R.Derron und P.Neumann,Biochem. 7,621
(1968)
- 36) O.Smithies, D.Gibson, E.M. Fanning, R.M.Goodflies,
J.G. Gilman und D.L. Ballantyne,Biochemistry10,4912
(1971)
- 37) J.Franke,Diplomarbeit, Bochum (1976)
- 38) G.Pfleiderer und K.Mella, FEBS-Symposium 18, 151(1970)
- 39) H.Krönke, Staatsarbeit, Bochum (1975)
- 40) J.J. Holbrook und R.A. Stinson, Biochem. J. 120, 289
(1970)
- 41) D.Jeckel, Habilitationsschrift, Bochum (1976)
- 42) J.F. Biellmann und N.Rosenheimer,FEBS Letters 34,143
(1973)
- 43) J.J.Holbrook, Privatmitteilung (1976)
- 44) J.J.Holbrook, A.Liljas, S.J.Steindel und M.G.Rossmann
„Lactate Dehydrogenase“, in The Enzymes (Boyer Ed.)
XI, 257 ff, Acad.Press, New York,San Franzisko,London
(1975)
- 45) D.Jeckel, Private Mitteilung (1976)
- 46) W.Eventoff, Brief vom 29.4.1976
- 47) S.S.Taylor, Brief vom 28.4.1976

L e b e n s l a u f

- 4.5.1948 Geburt als drittes Kind des Maschinen-
schlossers Wilhelm Keil und seiner
Ehefrau Sieghilde, geb.Geyer, in
Hof a.d.Saale.
- April 1954 Umsiedlung meiner Familie nach Bochum
und Einschulung in die Volksschule an
der Drusenbergstraße.
- April 1958 Aufnahme in die Jacob-Mayer-Realschule
- April 1963 Wechsel zur Goethe Schule in Bochum.
- November 1966 Abitur.
- Januar 1967 Beginn der Militärzeit in Handorf b.
Münster.
- April 1968 Studienbeginn im Fach Chemie an der
Universität Münster.
- Oktober 1970 Diplomvorexamen.
- 29.10.1970 Eheschließung mit Margarethe Deventer.
- November 1970 Fortsetzung des Studiums an der Uni-
versität Dortmund.

Juni 1972 Diplomhauptexamen.

November 1972 Beginn der Diplomarbeit am
 Biochemischen Institut der Ruhr-
 Universität Bochum.

Januar 1974 Beginn der Doktorarbeit am
 Biochemischen Institut der Ruhr-
 Universität Bochum.



